

# Ultrakurze Laserpulse als optische Schalter in enzymatischen Umsetzungen

## Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Stefanie Kohse**

geboren am 18.11.1980 in Wolgast

**Rostock 2013**



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chemie der Universität Rostock unter der Anleitung von Prof. Dr. Udo Kragl, begleitet von Prof. Dr. Stefan Lochbrunner in der Zeit von Oktober 2009 bis November 2013 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Kragl  
Institut für Chemie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Lochbrunner  
Institut für Physik, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Bornscheuer  
Institut für Biochemie, Universität Greifswald

Datum der Einreichung: 20.11.2013

Datum der Verteidigung: 15.04.2014





# Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Udo Prof. Kragl und Prof. Dr. Stefan Lochbrunner für die Anregung zu dieser interessanten, interdisziplinären Fragestellung bedanken. Darüber hinaus gilt ihnen mein Dank für die gute Betreuung und für die Möglichkeit die Arbeit in beiden Arbeitsgruppen anfertigen zu können. Auch für die fachliche Unterstützung und die zahlreichen fruchtbaren Diskussionsrunden möchte ich mich bedanken. Ich danke weiterhin der Interdisziplinären Fakultät für die Finanzierung der Arbeit durch ein Stipendium der Profillinie Licht, Leben & Materie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Antje Neubauer. Danke zu allererst für die fachliche Unterstützung in allen physikalischen Fragestellungen. Danke aber auch für die vielen, intensiven Diskussionen, für das häufige Aufbauen, wenn ich kurz vor der Verzweiflung stand, für das Lesen und die Korrektur der vielen Manuskripte und für die zahlreichen Ratschläge. Danke, dass Du mir gezeigt hast, dass neue Probleme oft nur bedeuten neue Lösungen zu finden. Schließlich auch ein Dankeschön für die Vermittlung zwischen den Welten der Chemie und der Physik.

Ich möchte mich auch bei Dr. Jan von Langermann und Dr. Henrik Lund für die schnelle Korrektur der Arbeit und die stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Arbeitsgruppe bedanken. An alle „Alten“ und „Neuen“ geht ein großes Dankeschön für das wirklich angenehme und kreative Arbeitsklima. Ich danke Sabine, Jenny, Diana, Julia, Claudia und Steffi dafür, dass immer jemand da war, mit dem man Probleme besprechen, Lösungen finden und Erfolge feiern konnte. Aber auch dafür, dass man am Ende des Tages mit einem Lächeln gehen konnte, weil es irgendetwas immer schaffte einen zum Lachen zu bringen.

Auch allen anderen danke ich für die guten Gespräche, vielen aufmunternden Worte und zahlreichen offenen Ohren, die mich schnell wieder aufgebaut haben, wenn es nötig war.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Freitag, Jana und Sandra bedanken, nun haben wir schon drei gute Seelen in unserem Labor.

Ich möchte mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe „Dynamik molekularer Systeme“ bedanken, dass ich herzlich aufgenommen wurde. Alexandra, Franziska, aber auch allen anderen danke ich für die Hilfestellungen und die gute Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Ruth für die Hilfestellungen in analytischen Fragen. Auch Frau Weihs danke ich für die Durchführung der IR-Analysen und Frau Duncker für die Durchführung der Elementaranalysen. Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Herr Kumm und Herr Riedel für die Entwicklung und Anfertigung verschiedener Apparaturen bedanken.

Auch meinen Freunden gilt mein großer Dank. Jenny, Henrik, Jule, Karo, Konny, Stefan, Sabine und Diana möchte ich für die Unterstützung danken. Gute Freunde sind wichtig um schöne Momente zu teilen, aber auch um problematische Zeiten leichter zu überstehen. Wenn manche Namen doppelt auftauchen, liegt das daran, dass viele Mitstreiter auch zu Freunden geworden sind. Deswegen gilt ihnen mein Dank auch doppelt.

Meiner ganzen Familie, insbesondere Mutti, Papa, Katarina, Stephan, Gregor, Oma, Netti und Jan (aber eben auch allen anderen) gilt ein ganz besonders großer Dank. Nur der Rückhalt der Familie macht einen stark für die Überraschungen und Herausforderungen, die das Leben für einen bereithält.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Uwe bedanken. Ich kann Dir nicht oft genug vor allem für Deine Liebe, aber auch für Deine unendliche Geduld danken.

„In den Wissenschaften ist viel Gewisses, sobald man sich von den Ausnahmen nicht irre machen lässt und die Probleme zu ehren weiß.“

Johann Wolfgang von Goethe





# Erklärungen

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Rostock, den \_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Stefanie Kohse

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich, Stefanie Kohse (Matr.-Nr.: 3200131) die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den \_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Stefanie Kohse



## **Kurzzusammenfassung**

Die Weiterentwicklung experimenteller Methoden, wie z. B. der zeitaufgelösten Spektroskopie, erlaubt die Verfolgung enzymatischer Reaktionen und ihrer Teilprozesse in biologisch relevanten Zeitskalen. Für die Echtzeitanalyse und die dafür notwendige zeitliche Kontrolle biomolekularer Vorgänge ist die Verwendung externer Auslöseimpulse ein geeignetes Verfahren. Dabei bietet die Verwendung von Licht als Signalgeber eine hohe zeitliche und örtliche Auflösung.

Das zentrale Ziel der hier vorgestellten Arbeit war die erfolgreiche optische Kontrolle der Aktivität hydrolytischer Enzyme durch die Anwendung eines laserinduzierten pH-Sprunges.

Nach der Charakterisierung der Einzelkomponenten des Aktivierungssystems konnte im ersten Teil der Arbeit eine 100 %ige Aktivierung des Enzyms durch die Methode der laserinduzierten pH-Sprungaktivierung im Zeitregime von Millisekunden belegt werden. Im Mittelpunkt des zweiten Teils stand die Optimierung der pH-Sprungaktivierung. Hier konnte erfolgreich die Photoschaltung der Enzymreaktion durch Anregung im Nanosekunden-Bereich gezeigt werden.

Die vorgestellte Arbeit zeigt das Potenzial der laserinduzierten Enzymaktivierung für eine mögliche Anwendung in der Echtzeitanalyse proteinogener Systeme. Mit der Realisierung wird die Anwendungsbreite der photoinitierten Protonenfreisetzung entschieden erweitert. Gleichzeitig liefert die Methode eine allgemeine und flexible Methode der Enzymaktivierung im Vergleich zu bestehenden Aktivierungsmethoden.

## **Abstract**

The advancement of experimental methods, like time resolved spectroscopy, allows monitoring of enzymatic reactions and its sub-processes in biological relevant timescales. For real-time analysis, as well as the related temporal control of biomolecular processes, the use of trigger signals is suitable. The application of light as trigger therefore offers a high temporal and spatial resolution.

The central objective of the presented work was the successful remote control of hydrolytic enzyme activity via laser-induced pH-jump.

After characterizing the single components of the system, in the first part of this work the total activation of the enzyme due to laser-induced pH-jump activation was proved. The main focus of the second part of this work was the optimization of the time resolution. Here, successful photoswitch of enzymatic activity via excitation in the nanosecond-range could be demonstrated.

The presented laser-induced enzyme activation provides the potential of application in real-time analysis of proteinogenic systems. By this general activation method the range of application of photo released protons is clearly expanded. At the same time this technique offers a general and flexible method of enzyme activation compared to existing methods.





---

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	X
Verwendete Größen und Maßeinheiten .....	XII
1. Einleitung und Zielsetzung .....	1
2. Theoretische Grundlagen .....	5
2.1. Biokatalysatoren .....	5
2.1.1. Der enzymkatalytische Prozess .....	6
2.1.2. Saure Phosphatasen .....	9
2.2. Sprungverfahren zur externen Steuerung von enzymatischen Reaktionen .....	12
2.2.1. pH-Sprung-Reagenzien .....	17
2.2.2. 2-Nitrobenzaldehyd als Triggersubstrat für die Erzeugung von pH-Sprüngen .....	21
3. Material und Methoden .....	24
3.1. Absorptionsmessung zur Bestimmung der Enzymaktivität .....	24
3.1.1. Ermittlung der enzymatischen Aktivität durch die Hydrolyse von 2-Carboxy-phenylphosphat .....	24
3.1.2. Ermittlung der enzymatischen Aktivität durch die Hydrolyse von 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferonphosphat .....	25
3.1.3. Absorptionsmessung zur Bestimmung der Säurekonstante des 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferons .....	26
3.1.4. Kinetische Untersuchungen .....	27
3.1.5. Bestimmung des Einflusses der photoaktivierbaren Substanzen auf die enzymatische Aktivität .....	28
3.2. Charakterisierung der verwendeten photoaktivierbaren Verbindungen .....	28
3.2.1. Charakterisierung des 2-Nitrobenzaldehydes .....	28
3.2.2. Charakterisierung der 4-Halogen-2-Nitrobenzaldehyde .....	29

---

3.3. Laserinduzierte Anregung .....	31
3.3.1. Allgemeine Probenvorbereitung .....	31
3.3.2. Aufbau und Durchführung der laserinduzierten Anregung .....	32
3.4. Detektion in den Aktivierungsexperimenten .....	38
3.4.1. Fluoreszenzmessung zur Verfolgung der Enzymaktivität.....	38
3.4.2. Detektion des pH-Sprunges .....	39
3.4.3. Detektion der Enzymaktivierung.....	40
4. Ergebnisse und Diskussion .....	41
4.1. Demonstration der pH-Sprunggenerierung im Millisekunden-Bereich .....	42
4.1.1. Charakterisierung der Photolyse von 2-Nitrobenzaldehyd .....	43
4.1.2. pH-Sprunggenerierung und Optimierung des pH-Sprungsystems .....	47
4.2. Untersuchungen zur laserinduzierten Enzymaktivierung.....	54
4.2.1. Einführung ausgewählter Reaktionen der sauren Phosphatase.....	55
4.2.2. Die Aktivität der sauren Phosphatase unter Berücksichtigung verschiedener Einflussfaktoren.....	58
4.2.3. Gelelektrophorese zur Bestimmung der molaren Masse und Reinheit des Enzyms .....	63
4.2.4. Kinetische Untersuchungen der enzymatischen Reaktion .....	64
4.2.5. Einfluss der Laserstrahlung auf die enzymatische Aktivität.....	67
4.2.6. Einfluss des 2-Nitrobenzaldehydes auf die enzymatische Aktivität .....	71
4.2.7. Untersuchung der laserinduzierten Enzymaktivierung .....	72
4.3. Demonstration der pH-Sprunggenerierung im Nanosekunden-Bereich.....	75
4.3.1. pH-Sprungverhalten bei Übergang der Anregungszeit in den Nanosekunden- Bereich .....	76
4.3.2. pH-Sprungverhalten weiterer verwendeter 2-Nitrobenzaldehydderivate .....	78
4.3.3. Untersuchung der photolytischen Reaktion durch Actinometermessungen.....	83
4.3.4. Charakterisierung des pH-Sprungverhaltens des bevorzugten Anregungssystems.....	85
4.4. Untersuchung zur laserinduzierten Enzymaktivierung durch Anregung im Nanosekunden- Bereich .....	89

---



---

4.4.1.	Untersuchung der laserinduzierten Enzymaktivierung .....	90
5.	Zusammenfassung und Ausblick .....	94
6.	Anhang .....	98
6.1.	Literatur .....	98
6.2.	Chemikalien .....	111
6.3.	Geräte .....	112
6.4.	Verbindungsverzeichnis .....	113
6.5.	Ergänzende experimentelle Daten .....	118
6.5.1.	Fluorescein als pH-Indikator .....	118
6.5.2.	Zersetzung der Salicylsäure.....	119
6.5.3.	Durchführung der Gelektrophorese.....	120
6.5.4.	Bestimmung des Eisengehaltes des Enzymrohextraktes.....	121
6.5.5.	Empirische Berechnung der Ionenstärke aus der Leitfähigkeit des enzymatischen Systems .....	121
6.5.6.	Absorptionsspektren des pH-Sprung- und des enzymatischen Systems .....	122
6.5.7.	Charakterisierung der photoaktivierbaren Substrate .....	124
6.5.8.	Charakterisierung des Anregungsstrahlenganges .....	125
6.5.9.	Betrachtung der Diffusion in wässriger Lösung .....	125
6.5.10.	Einfluss der Laserstrahlung auf die enzymatische Aktivität.....	126
6.5.11.	Einfluss der Triggersubstrate auf die enzymatische Aktivität .....	128
6.5.12.	Abhängigkeit der Enzymaktivierung von der Anzahl der Anregungspulse .....	129

---

---

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Schematische Darstellung der lichtinduzierten pH-Sprungaktivierung.....	3
Abbildung 2.	Einordnung der vorgestellten Studie in den Stand der Forschung .....	4
Abbildung 3.	Einteilung der Enzyme entsprechend ihrer natürlich bevorzugten Reaktionen in die sechs Enzymklassen der EC-Nomenklatur.....	5
Abbildung 4.	Reaktionsprofil der freien Enthalpie für eine nichtkatalysierte Reaktion im Vergleich zur enzymkatalysierten Reaktion nach der Theorie des Übergangszustandes.....	7
Abbildung 5.	Schematische Übersicht über die Zeitskalen relevanter Prozesse in der Enzymkatalyse.....	8
Abbildung 6.	Einteilung der Phosphatasen .....	9
Abbildung 7.	Postulierter Mechanismus der „purple acid“ Phosphatasen.....	11
Abbildung 8.	Sprungverfahren für die Untersuchung enzymatischer Prozesse .....	13
Abbildung 9.	Reaktionsschema der Bindungsbildung für die Lactatdehydrogenase.....	14
Abbildung 10.	Funktionsprinzip photolabiler Schutzgruppen zur Erzeugung eines sprunghaften Konzentrationsgradienten .....	14
Abbildung 11.	Lichtinduzierte, reversible Protonenfreisetzung durch Anregung von Photosäuren .....	17
Abbildung 12.	2-Nitrobenzyllderivate zur photolytischen Protonenfreisetzung .....	19
Abbildung 13.	Postulierter Mechanismus der photolytischen, intramolekularen Umlagerung des 2-Nitrobenzaldehydes .....	21
Abbildung 14.	Enzymatische Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat zu Salicylsäure durch die saure Phosphatase .....	24
Abbildung 15.	Enzymatische Hydrolyse von CF-MUP zu CF-MU durch die saure Phosphatase .....	25
Abbildung 16.	Graphische Auswertung der Titrationskurve zur Bestimmung des $pK_s$ -Wertes .....	26
Abbildung 17.	Experimenteller Aufbau für die Anregung der photolytischen Umlagerung des 2-Nitrobenzaldehydes zur Charakterisierung der Photolysereaktion .....	29
Abbildung 18.	Photometrische Verfolgung der pH-Titration der 2-Nitrosobenzoessäure.....	30
Abbildung 19.	Experimentelle Aufbauten für die Erzeugung laserinduzierter pH-Sprünge .....	32
Abbildung 20.	Geometrisches Strahlprofil des Nd-YAG-Lasers.....	35
Abbildung 21.	Geometrisches Strahlprofil des Nd-YAG-Lasers nach Optimierung des experimen- tellen Aufbaus.....	36
Abbildung 22.	Zeitliches Pulsprofil des Anregungsstrahls .....	37
Abbildung 23.	pH-abhängiges Absorptionsverhalten des Fluoresceins .....	39

---

Abbildung 24. Übersichtsgraphik der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen .....	41
Abbildung 25. Zeitliche Verfolgung der photochemischen Umsetzung des 2-Nitrobenzaldehydes .....	44
Abbildung 26. Extinktionsdifferenzendiagramm der photolytischen Umsetzung von 2-Nitrobenzaldehyd .....	44
Abbildung 27. Zeitliche Verfolgung der photolytischen Umsetzung für das Photosubstrat 2-Nitrobenzaldehyd und für das Photoprodukt 2-Nitrosobenzoessäure .....	45
Abbildung 28. Zeitliche Verfolgung der photolytischen Umsetzung bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm .....	46
Abbildung 29. Zeitliche Verfolgung des laserinduzierten pH-Sprunges über die Absorptionsänderung des Fluoresceins und den pH-Wert .....	47
Abbildung 30. pH-Sprungverhalten des 2-Nitrobenzaldehydes in Abhängigkeit der Anregungszeit .....	48
Abbildung 31. pH-Sprungverhalten des 2-Nitrobenzaldehydes initial und im Gleichgewicht in Abhängigkeit der Anregungszeit .....	49
Abbildung 32. pH-Sprungverhalten des 2-Nitrobenzaldehydes unter Zusatz der Komponenten des enzymatischen Systems .....	51
Abbildung 33. pH-Sprungverhalten im Gesamtreaktionssystem mit einer Anregungszeit von 750 ms und 250 ms .....	52
Abbildung 34. pH-Sprung-Experimente in Abhängigkeit der Enzymkonzentration .....	53
Abbildung 35. Substrate zur Aktivitätsbestimmung saurer Phosphatasen .....	55
Abbildung 36. Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum einer wässrigen Salicylsäurelösung .....	56
Abbildung 37. Absorptionsspektren der Reaktionsgemische des pH-Sprungsystems .....	57
Abbildung 38. Thermische Stabilität der Phosphatase bei 25 °C .....	59
Abbildung 39. pH-Profil der sauren Phosphatase aus der Kartoffel bei variierendem Substrat und Medium .....	59
Abbildung 40. Einfluss der Ionenstärke auf die Aktivität der sauren Phosphatase .....	60
Abbildung 41. Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der sauren Phosphatase .....	61
Abbildung 42. Stabilität der sauren Phosphatase im basischen Milieu .....	62
Abbildung 43. Gelelektrophorese der sauren Phosphatase aus der Kartoffel .....	63
Abbildung 44. Michaelis-Menten Kinetik der sauren Phosphatase aus der Kartoffel für die Hydrolyse von CF-MUP .....	65
Abbildung 45. Michaelis-Menten Kinetik der sauren Phosphatase aus der Kartoffel für die Hydrolyse von CF-MUP in Abhängigkeit des pH-Wertes .....	65
Abbildung 46. Absorptionsspektrum der sauren Phosphatase aus der Kartoffel .....	68

---

---

Abbildung 47. Einfluss von Laserstrahlung bei einer Anregungswellenlänge von 265 nm auf die Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase bei verschiedenen Laserleistungen.....	69
Abbildung 48. Einfluss von Laserstrahlung bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm auf die Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase.....	70
Abbildung 49. Einfluss des 2-Nitrobenzaldehydes und verschiedene Verhältnisse von 2-NBA/2-NBS auf die enzymatische Aktivität.....	71
Abbildung 50. A: Absorptionsspektren einer wässrigen 100 $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehyd-Lösung vor und nach der Anregung B: zeitliche Verfolgung der Absorptionsspektren des pH-Sprungsystems C: aus der optischen Anregung resultierende Aktivierung der hydrolytischen Umsetzung von CF-MUP durch die saure Phosphatase bei verschiedenen Enzymkonzentrationen D: aus der Anregung resultierender pH-Sprung .....	73
Abbildung 51. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der aktivierten Enzymreaktion von der Konzentration des eingesetzten Enzyms .....	74
Abbildung 52. pH-Sprung einer 500 $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehyd-Lösung im Vergleich beider experimenteller Anordnungen .....	77
Abbildung 53. pH-Sprung einer 500 $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehyd-Lösung durch Einzelpulsanregung mit rund 6 ns.....	78
Abbildung 54. pH-Sprungverhalten der halogenierten 2-Nitrobenzaldehydderivate .....	81
Abbildung 55. pH-Sprung einer 500 $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehyd-Lösung im Vergleich von Einzelpuls- und Mehrpulsanregung .....	85
Abbildung 56. pH-Sprung einer 500 $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehyd-Lösung bei variierender Anzahl von Anregungspulsen .....	86
Abbildung 57. Initiale Hydroniumionenkonzentration und Rückgang der Hydroniumionenkonzentration bei variierender Anzahl der Anregungspulse.....	87
Abbildung 58. pH-Sprung einer 500 $\mu$ M und einer 750 $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehyd-Lösung im Vergleich.....	88
Abbildung 59. pH-Sprung einer 750 $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehyd-Lösung im reinen pH-Sprung- und im enzymatischen Gesamtsystem für die Anregung mit 7 Pulsen und Langzeitaufnahme des pH-Sprungverhaltens im enzymatischen Gesamtsystem für die Einzelpulsanregung und für die Anregung mit 7 Pulsen .....	88
Abbildung 60. Laserinduzierte Aktivierung der enzymatischen Hydrolyse für die Mehrpulsanregung ....	91
Abbildung 61. Laserinduzierte Aktivierung der enzymatischen Hydrolyse für die Einzelpulsanregung .....	91

---

---

Abbildung 62. Laserinduzierte Aktivierung der enzymatischen Hydrolyse in Abhängigkeit der Anregungszeit .....	92
Abbildung 63. Absorptionsverhalten des Fluoresceins und Bromkresolgrün in Abhängigkeit des pH-Wertes im Vergleich .....	118
Abbildung 64. Kalibrierung der 3 $\mu$ M Fluoresceinlösung .....	118
Abbildung 65. Zersetzung der Salicylsäure unter UV-Anregung .....	119
Abbildung 66. Absorptionsspektrum einer wässrigen 100 $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehydlösung.....	122
Abbildung 67. Spektren des pH-Sprungsystems – Vorgang der Auswertung .....	123
Abbildung 68. Spektren des Gesamtsystems der pH-Sprungexperimente nach Untergrundkorrektur und Abzug des 2-NBA-Signals.....	123
Abbildung 69. Absorptionsspektren des 2-Nitrobenzaldehydes und der halogenierten 2-Nitrobenzaldehydderivate .....	124
Abbildung 70. Zeitliches Pulsprofil des Anregungsstrahls.....	125
Abbildung 71. Örtliche Inhomogenitäten des Anregungsstrahlenganges.....	126
Abbildung 72. Einfluss der Anregungsstrahlung auf die Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase. 127	
Abbildung 73. Einfluss des 2-Nitrobenzaldehydes und der verwendeten Halogenderivate auf die enzymatische Aktivität.....	128
Abbildung 74. Laserinduzierte Aktivierung der enzymatischen Hydrolyse in Abhängigkeit der Anregungszeit – Originalmesskurven.....	129

---

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Beispiele für Beschleunigungsraten enzymkatalysierter Reaktionen.....	5
Tabelle 2.	Phenacylderivate zur lichtinduzierten Protonenfreisetzung .....	18
Tabelle 3.	Durch 2-Nitrobenzaldehyd getriggerte pH-Sprung-Studien in proteinogenen Systemen.....	23
Tabelle 4.	Allgemeine Bedingungen zur Bestimmung der Aktivität über die Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat.....	24
Tabelle 5.	Allgemeine Bedingungen zur Bestimmung der Aktivität über die Hydrolyse von CF-MUP .....	26
Tabelle 6.	Versuchsbedingungen für die präparative Photolyse von 2-Nitrobenzaldehyd und seinen halogenierten Derivaten.....	29
Tabelle 7.	Zusammenfassung der Probenzusammensetzung der verschiedenen laserinduzierten pH-Sprungexperimente .....	31
Tabelle 8.	Zusammensetzung relevanter Aminosäuren und Zucker der sauren Phosphatase aus der Kartoffel.....	53
Tabelle 9.	Kinetische Parameter der Hydrolyse von CF-MUP bei variierendem pH-Wert.....	67
Tabelle 10.	Reaktionsraten der laserinduzierten pH-Sprung-Aktivierung im Vergleich zur konventionellen enzymatischen Umsetzung unter äquivalenten Bedingungen .....	75
Tabelle 11.	Übersicht über relevante Eigenschaften der untersuchten photoaktivierbaren Verbindungen .....	79
Tabelle 12.	Ermittelte Laserleistungen für die Photolysereaktion.....	83
Tabelle 13.	Beispielenzyme für die Erweiterung der lichtinduzierten pH-Wertkontrolle der Enzymaktivität .....	97
Tabelle 14.	Liste verwendeter Chemikalien .....	111
Tabelle 15.	Liste verwendeter Geräte .....	112
Tabelle 16.	Strukturformeln aller anführten Verbindungen .....	113
Tabelle 17.	Bedingungen zur Denaturierung von Proteinproben.....	120
Tabelle 18.	Bedingungen der Gelelektrophorese.....	120
Tabelle 19.	Leitfähigkeiten und daraus ermittelte Ionenstärken verwendeter Substratlösungen .....	121
Tabelle 20.	Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase unter Einfluss der Anregungsstrahlung mit einer Wellenlänge von 355 nm .....	126

---

# Abkürzungsverzeichnis

2-NBA	2-Nitrobenzaldehyd
2-NBS	2-Nitrosobenzoessäure
4-Br-2-NBA	4-Bromo-2-nitrobenzaldehyd
4-Cl-2-NBA	4-Chloro-2-nitrobenzaldehyd
4-F-2-NBA	4-Fluoro-2-nitrobenzaldehyd
APasen	saure Phosphatase (acid phosphatase)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BA	bioaktive Verbindung
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF-MU(P)	6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferon(phosphat)
CPP	2-Carboxyphenylphosphat
cw	kontinuierliche Lichtquelle (continuous wave)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Enzym
EC	Enzyme Commission
EP	Enzym-Produkt-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
EtOH	Ethanol
exc	Anregung (excitation)
FM-NP-Essigsäure	4-Formyl-6-methoxy-3-nitrophenoxyessigsäure
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie
FWHM	Full Width at Half Maximum
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
HOAc	Essigsäure
HP-NPE-Phosphat	2-Hydroxyphenyl-1-(2-nitrophenyl)ethylphosphat
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat
IR	Infrarot
IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDH	Lactatdehydrogenase



---

mut	Mutante
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Nd-YAG	Neodym Yttrium-Aluminium-Granat
NMR	Kern(spin)resonanzspektroskopie
NOPA	nicht-kollinear optisch parametrischer Verstärker (noncollinear optical parametric amplifier)
NPE-Sulfat	1-(2-Nitrophenyl)ethylsulfat
OMP	Orotidin-5'-Phosphat
P	Produkt
PAPase	lilafarbene, saure Phosphatase (purple acid Phosphatase)
POR	Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
S	Standardabweichung
S	Substrat
SHG	Frequenzverdopplung (second harmonic generation)
THG	Frequenzverdreifachung (third harmonic generation)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbarer Bereich des elektromagnetischen Spektrums (visual)

# Verwendete Größen und Maßeinheiten

Größe	Formelzeichen	Einheit	verwendete Einheiten
Enzymaktivität	$A$	kat	U/mg, $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , $\mu\text{M}/\text{min}$
Konzentration	$c$	mol/L	$\mu\text{M}$ , mM
Dissoziationsgrad	$\alpha$	-	-
Schichtdicke	$d$	m	cm
Energie	$E$	J	J
Aktivierungsenergie	$E_A$	J/mol	kJ/mol
Extinktionskoeffizient	$\varepsilon$	L/(mol·cm)	1/(mM·cm)
Fläche	$F$	-	-
Quantenausbeute	$\phi$	-	-
Enthalpie	$G$	J/mol	kJ/mol
Ionenstärke	$I$	mol/L	mol/L
Photonenfluss	$I_\lambda$	mol/(L·s)	mol/(L·s)
Geschwindigkeitskonstante der Photolyse	$j$	s <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>
Michaelis-Menten Konstante	$K_M$	mol/L	$\mu\text{mol}/\text{L}$
Säurekonstante	$K_S, pK_S$	mol/L, -	mol/L, -
Wellenlänge	$\lambda$	nm	nm
Molare Masse	$M$	g/mol	kDa
Avogadrokonstante	$N_A$	mol <sup>-1</sup>	mol <sup>-1</sup>
Anzahl der Anregungspulse	$N_{\text{Pulse}}$	-	-
optische Dichte (gleichbedeutend Extinktion)	$OD$	-	-
Leistung	$P$	W	$\mu\text{W}$ , mW, W, MW
pH-Wert	$pH$	-	-
Temperatur	$T$	K	°C, K
universelle Gaskonstante	$R$	J/mol	kJ/mol
Zeit	$t$	s	as, fs, ps, ns, $\mu\text{s}$ , ms, s, min
Reaktionsgeschwindigkeit	$v$	mol/s	U/mg, $\mu\text{M}/\text{min}$ , $\mu\text{M}/(\text{min}\cdot\text{mg})$
maximale Reaktionsgeschwindigkeit	$V_{\text{Max}}$	mol/s	U/mg, $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$
Volumen	$V$	L	$\mu\text{L}$ , mL, L

# 1. Einleitung und Zielsetzung

Die Kontrolle und speziell die externe Steuerung der Aktivität biochemischer Prozesse ist in der heutigen Forschung von großem Interesse. [Callender und Dyer, 2006; Mayer und Heckel, 2006; Kamada *et al.*, 2011; Rosell und Mauk, 2011] Eine wichtige Aufgabe in der Untersuchung biochemischer Prozesse ist die möglichst lückenlose Beschreibung der Enzymkatalyse, die tiefere Einsichten in die komplexe interne Dynamik enzymatischer Reaktionssysteme versprechen. Für die detaillierte Untersuchung und die dafür notwendige zeitliche Kontrolle biomolekularer Vorgänge ist die Verwendung von Triggersignalen ein geeignetes Verfahren. In diesem Zusammenhang bietet gerade die Verwendung von Licht als Signalgeber einige Vorteile. So werden Proteine, mit Ausnahme von Photorezeptoren, in Abhängigkeit der verwendeten Wellenlänge, durch die Anregung von Licht kaum in ihrer Funktion beschädigt. [Mayer und Heckel, 2006] Darüber hinaus erzielt man durch die Verwendung von Lasern als Lichtquelle eine hohe zeitliche, sowie örtliche Auflösung. [Gorostiza und Isacoff, 2008] Diese übersteigt dabei die Möglichkeiten anderer Techniken, wie z. B. Mikromischtechniken. [Chan *et al.*, 1997; Jeong *et al.*, 2010]

In den vergangenen Jahren wurden zunehmend photosensitive Proteine durch lichtvermittelte Aktivierung in ihrer Funktion untersucht. Dies führte zu zahlreichen mechanistischen Echtzeitstudien biomolekularer Prozesse, z. B. Elektronen- oder Hydridtransferprozessen. Eines der am häufigsten untersuchten photosensitiven Proteine ist das grün fluoreszierende Protein (GFP, green fluorescent protein). Eine große Anzahl verschiedener Studien hinsichtlich der Decarboxylierung [Bell *et al.*, 2003; Langhojer *et al.*, 2009], dem Protonentransfer [Chattoraj *et al.*, 1996; Faro *et al.*, 2010] oder der *E-Z* Isomerisierung [Abbruzzetti *et al.*, 2010; Addison *et al.*, 2012; Ai *et al.*, 2012] führten zu einer Fülle an Informationen über die Chemie des angeregten Zustandes des GFPs [Meech, 2009; van Thor, 2009]. Eine weitere bekannte lichtgesteuerte Reaktion ist die Reduktion des Protochlorophyllid innerhalb der Chlorophyll-Biosynthese durch die Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR). Dieses Enzym wird häufig als Modellenzym für Protonen- oder Hydridtransferstudien sowie für Untersuchungen zu auftretenden Konformationsänderungen oder Lösungsmittelfluktuationen genutzt. [Solymosi *et al.*, 2007; Sytina *et al.*, 2008; Zhao und Han, 2008; Durin *et al.*, 2009; Hanf *et al.*, 2011; Sytina *et al.*, 2012] Auch die DNA-Photolyase ist ein Beispiel für die erfolgreiche Untersuchung lichtaktivierbarer Enzyme. [Kao *et al.*, 2007; Zhong, 2007; Okafuji *et al.*, 2010]

Verlässt man die grundsätzlich lichtgesteuerten Proteine, so dient häufig die photochemische Freisetzung von bioaktiven Substanzen der optischen Aktivierung von Enzymen. [Pelliccioli und Wirz, 2002]

Die Anwendung photolabiler Schutzgruppen für die Untersuchung biochemischer Systeme startete mit der Arbeit von Kaplan, der die photolytische Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP) nutzte, um die Aktivität der Na,K-ATPase zu initiieren. [Kaplan *et al.*, 1978] Exzellente Arbeiten in erheblichem Umfang folgten dem Prinzip der Enzymaktivierung durch die Freisetzung von Botenstoffen, darunter ATP, cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Glutamat oder andere Aminosäuren. [Pelliccioli und Wirz, 2002; Mayer und Heckel, 2006; Lee *et al.*, 2009] Selbst die optische Steuerung von Enzymen über die Einführung photolabiler Gruppen via Proteinengineering von Enzymen wurde berichtet. [Chang *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2002; Gorostiza und Isacoff, 2008]

Alle diese Methoden sind jedoch, mehr oder weniger abhängig von den bioaktiven Verbindungen, für eine bestimmte Gruppe von Enzymen maßgeschneidert. Darüber hinaus sind sie, gerade im Hinblick auf den Einsatz von Proteinengineering, mit erheblichem Aufwand verbunden. Daher werden für die lichtinitiierte Kontrolle von biologischen Funktionen verstärkt allgemeine Verfahren benötigt, wie Young und Deiters in ihrem Review forderten. [Young und Deiters, 2007]

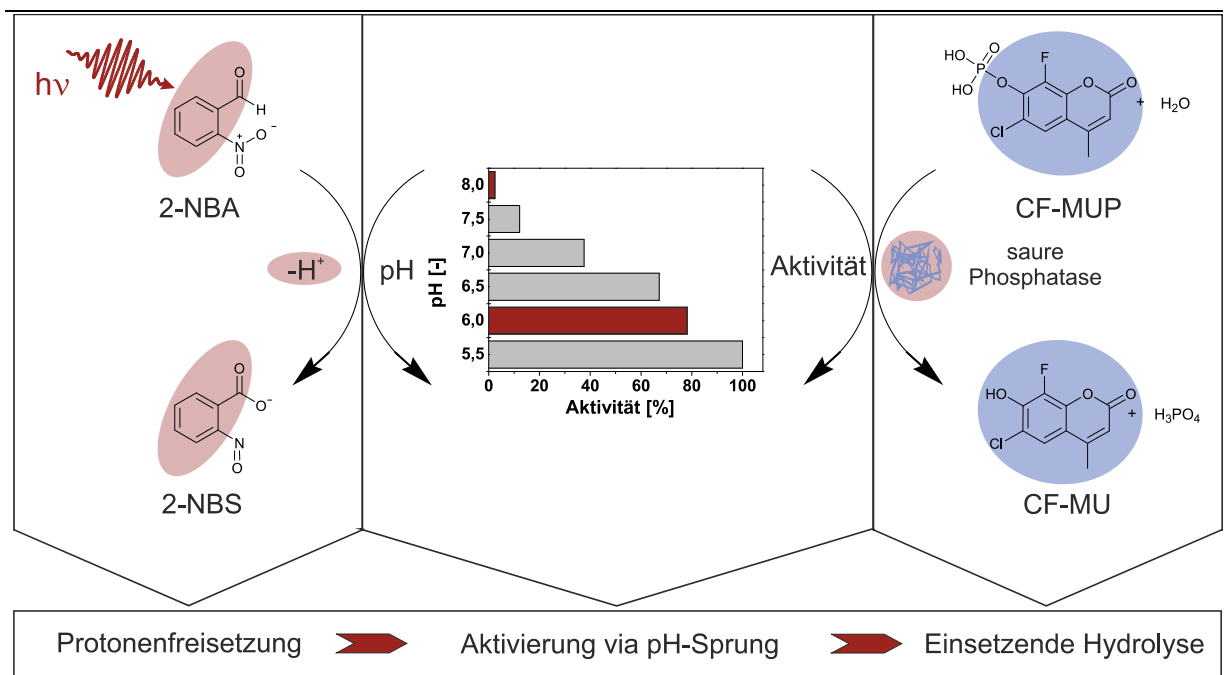
Die Erzeugung sprunghafter Änderungen durch pH-Sprungreagenzien ist eine bekannte und etablierte Technik. So werden sogenannte Photosäuren eingesetzt um reversible pH-Änderungen zu erzeugen. [Rini *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2009] In biochemischen Studien werden jedoch häufiger Protonen aus photolabilen Verbindungen freigesetzt um einen permanenten Sprung des pH-Wertes zu erzeugen. [Abbruzzetti *et al.*, 2003; Abbruzzetti *et al.*, 2006b; Rosell und Mauk, 2011] Obwohl diverse pH-Sprungreagenzien für die Erzeugung eines persistenten pH-Sprunges bekannt sind, ist ihre Anwendung als Werkzeug in biochemischen Studien bislang noch rar. [Rosell und Mauk, 2011] Mehrere Anwendungen dieser Methode für die Untersuchung von Proteinfaltungen, sowie Liganden-Bindungskinetiken kleinerer Proteine sind in der Literatur bereits bekannt. [Abbruzzetti *et al.*, 2001; Abbruzzetti *et al.*, 2006a; Causgrove und Dyer, 2006] Auf diesem Gebiet wurden eindrucksvolle Fortschritte vor allem hinsichtlich der Zeitauflösung erzielt. Allerdings ist die pH-Sprung-Methode bislang hauptsächlich auf die Anwendung in Faltungsstudien beschränkt. Teile dieses Kapitels wurden bereits in Form eines Artikels publiziert. [Kohse 2013]

Das Ziel dieser Arbeit ist die Präsentation einer Methode zur erfolgreichen optischen Kontrolle der Aktivität hydrolytischer Enzyme durch die Anwendung eines laserinduzierten pH-Sprunges in einer Mischung aus Enzym, Substrat und Triggersubstrat (Abbildung 1). Protonen als Triggersubstrat für die Aktivierung von biochemischen Prozessen bieten gegenüber den anderen vorgestellten Strategien einige Vorteile. Dieses Verfahren ist:

- i. anwendbar auf Enzyme, die nicht von Natur aus photosensitiv sind,
- ii. nicht beschränkt durch die Freisetzung spezieller bioaktiver Moleküle und
- iii. unabhängig vom Ursprung des Substrates und der Klasse des Enzyms.

Die Enzyme benötigen lediglich ein signifikantes pH-abhängiges Aktivitätsprofil, das die Steuerung der Aktivität über den pH-Wert erlaubt. Der vorgestellte Ansatz bietet die Möglichkeit der Aktivitätssteuerung für ein breites Spektrum an Enzymen und erweitert somit die Auswahl an Enzymen und Reaktionen, die photochemisch gesteuert werden können.

Das Gesamtreaktionssystem kann in zwei Elemente unterteilt werden, wie in Abbildung 1 dargestellt ist. Ein Bestandteil ist das photolytische pH-Sprungsystem und die zweite Komponente ist das enzymatische Reaktionssystem.



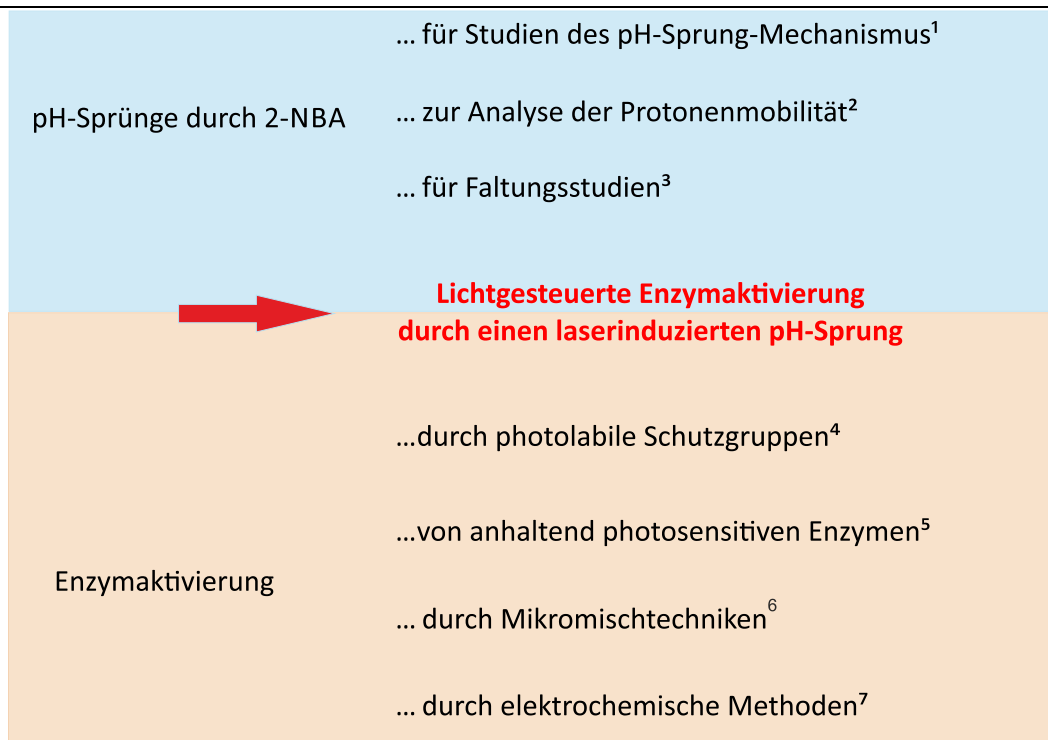
**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der lichtinduzierten pH-Sprungaktivierung

Die Erzeugung des pH-Sprunges erfolgt lichtinduziert durch Anregung von 2-Nitrobenzaldehyd (2-NBA). Die intramolekulare Umlagerung des 2-Nitrobenzaldehydes führt zur schnellen Bildung von Nitrosobenzoesäure, einer mittelstarken Säure welche als Protonendonator fungiert (Abbildung 1, links). Die Freisetzung der Protonen erfolgt dabei innerhalb von einigen Nanosekunden. [Laimgruber *et al.*, 2005; Donten *et al.*, 2011]

Das scharfe pH-abhängige Aktivitätsprofil des gewählten Enzyms ermöglicht eine Steuerung der enzymatischen Aktivität über die Änderung des umgebenden pH-Wertes (Abbildung 1, Mitte). Im Rahmen dieser Studie wurde ein hydrolytisches enzymatisches System verwendet, da sich die Hydrolyse ohne das Auftreten von Nebenreaktionen vollzieht und somit die Detektion und im Speziellen die Quantifizierung der enzymatischen Umsetzung erleichtert. Bei dem Enzym handelt es sich um die saure Phosphatase (EC 3.1.3.2, Typ IV-S aus *solanum tuberosum* L.), eine nichtspezifische Phosphomonoesterase. [Kruzel und Morawiecka, 1982]

Die einsetzende hydrolytische Aktivität der sauren Phosphatase soll schließlich durch die Umsetzung des Substrates 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferonphosphat (CF-MUP) bestimmt werden (Abbildung 1, rechts). [Yang *et al.*, 2008]

Das primäre Ziel der Arbeit ist die Realisierung der Enzymaktivierung durch die Anwendung des laserinduzierten pH-Sprunges. Aufgrund der Komplexität des verwendeten Systems besteht der erste Teil dieser Arbeit in der Beschreibung der Komponenten des pH-Sprung-Aktivierungssystems. Dazu werden sowohl die photochemische Umlagerung des 2-Nitrobenzaldehydes, als auch die saure Phosphatase und ihre enzymatische Umsetzung charakterisiert. Weiterhin erfolgen Untersuchungen zur Generierung eines für die weitere Analyse optimalen pH-Sprunges. Diese Erkenntnisse werden anschließend auf die Anregung im Gesamtsystem zur Erzeugung der Enzymaktivierung angewendet.



**Abbildung 2.** Einordnung der vorgestellten Studie in den Stand der Forschung (1: [Laimgruber *et al.*, 2005; Heinz *et al.*, 2008; Donten *et al.*, 2011]; 2: [Swietach *et al.*, 2007]; 3: [Abbruzzetti *et al.*, 2006b; Causgrove und Dyer, 2006]; 4: [Pelliccioli und Wirz, 2002; Mayer und Heckel, 2006; Lee *et al.*, 2009]; 5: [Saxena *et al.*, 2005; Meech, 2009; Addison *et al.*, 2012]; 6: [Chang *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2010]; 7: [Kamada *et al.*, 2011])

Mit der Realisierung der Enzymaktivierung durch die laserinduzierte pH-Sprungmethode wird die Anwendungsbreite der photoinitierten Protonenfreisetzung entschieden erweitert (Abbildung 2, oben). Gleichzeitig liefert diese Methode eine allgemeine und flexible Methode der Enzymaktivierung im Vergleich zu anderen bestehenden Aktivierungsmethoden (Abbildung 2, unten). Zudem besteht keine Beschränkung auf enzymatische Systeme, so ist prinzipiell auch eine Übertragung auf chemokatalytische sowie stöchiometrische Reaktionen denkbar.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Biokatalysatoren

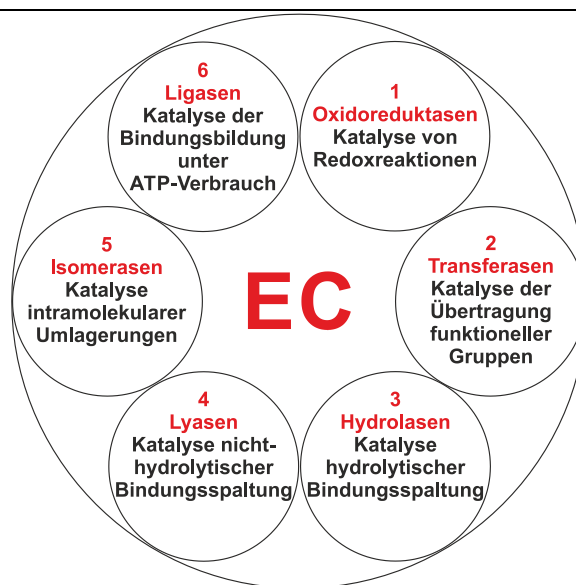
Enzyme sind hocheffektive Katalysatoren für eine Vielfalt an Reaktionen und können diese um mehrere Größenordnungen beschleunigen. [Stryer L. *et al.*, 2002] In Tabelle 1 werden zusammenfassend einige Beispiele für die Beschleunigungsraten natürlicher Reaktionen dargestellt.

**Tabelle 1.** Beispiele für Beschleunigungsraten enzymkatalysierter Reaktionen [Enzymdatenbank Brenda; Radzicka und Wolfenden, 1995]

Enzym	EC-Nummer	Reaktion	$S \xrightarrow{k_{kat}} P$	$k_{kat}/k_{nkat}$
OMP Decarboxylase	4.1.1.23	Orotidin-5'-monophosphat → Uridin-5'-monophosphat		$1,4 \cdot 10^{17}$
Adenosindeaminase	3.5.4.4	Adenosin → Inosin		$2,1 \cdot 10^{12}$
Phosphotriesterase	3.1.8.1	Aryldiakylphosphat → Dialkylphosphat		$2,8 \cdot 10^{11}$
Carbonanhydrase	4.2.1.1	Kohlenstoffdioxid → Hydrogencarbonat		$7,7 \cdot 10^6$

OMP Orotidin-5'-monophosphat,  $k_{kat}/k_{nkat}$  Quotient der Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten und unkatalysierten Reaktion

Es existieren Biokatalysatoren für die unterschiedlichsten Arten von Reaktionen, wobei bis heute mehr als 10000 Enzyme aus verschiedenen Organismen dokumentiert wurden. [Schomburg *et al.*, 2013] Um die Vielzahl existierender Enzyme zu klassifizieren, wurden diese, entsprechend ihrer natürlichen Funktion, 1984 durch eine gemeinsame Kommission der IUPAC und der IUB durch die Einführung sogenannter EC-Nummern in sechs Klassen eingeteilt. [Dixon, 1985]



**Abbildung 3.** Einteilung der Enzyme entsprechend ihrer natürlich bevorzugten Reaktionen in die sechs Enzymklassen der EC-Nomenklatur

In Abbildung 3 wird schematisch ein Überblick über die sechs Enzymklassen gegeben. Um eine weitere, detaillierte Einteilung der Enzyme vornehmen zu können, bestehen die EC-Nummern aus einem vierstelligen Code. Dieser erlaubt die Klassifizierung der Enzyme hinsichtlich der katalysierten Reaktion, der Art des Substrates und der Natur des Cosubstrates. Die letzte Ziffer stellt dabei lediglich eine fortlaufende Nummer dar. Wichtig ist an dieser Stelle zu bemerken, dass eine vollständige Charakterisierung eines Enzyms durch die Angabe der EC-Nummer nicht erfolgen kann, da darüber hinaus auch der biologische Ursprung des Enzyms entscheidend für seine Struktur und Eigenschaften ist.

Neben der Katalyse natürlicher Reaktionen werden Enzyme heutzutage auch in der Industrie vielfältig eingesetzt. Die Nutzung von Enzymen in der Biotechnologie beruht dabei auf einer Vielzahl von Vorteilen, die Enzyme als Biokatalysatoren mit sich bringen [Rozzell, 1999; Schoemaker *et al.*, 2003]:

- i. Reaktionsgeschwindigkeiten die etwa  $10^8$  mal höher sind als in unkatalysierten Reaktionen und um Größenordnungen höher als in der chemischen Katalyse
- ii. Hohe Effizienz der Biokatalysatoren (hohe turn over number)
- iii. Gute Umweltverträglichkeit
- iv. Katalyse unter milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, Atmosphärendruck, neutraler pH-Wert)
- v. Hohe Chemo Selektivität
- vi. Oft hohe Regio- und Stereoselektivität
- vii. keine Verwendung toxischer Übergangsmetallkatalysatoren (z. B. Rh, Pd, Pt)

Aus diesen Vorteilen ergeben sich vielfältige Verwendungsmöglichkeiten der Enzyme für industrielle Prozesse.

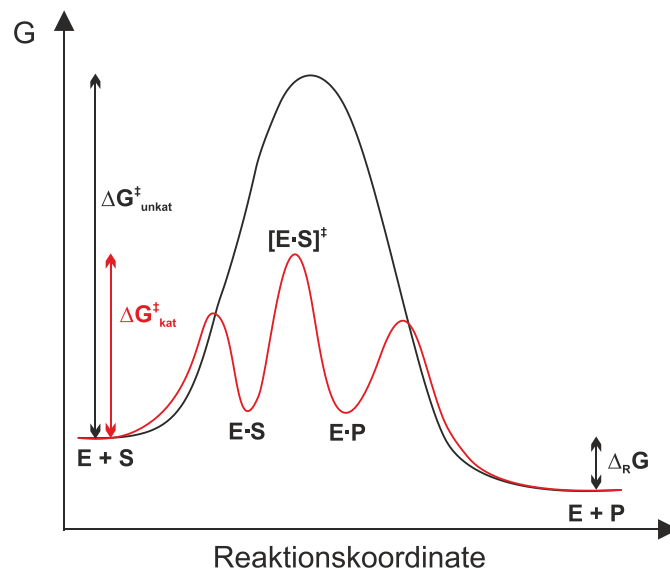
Abseits vom Einsatz der Enzyme in der Industrie ist eine Aufgabe der heutigen Forschung ein lückenloses Verständnis der Enzymkatalyse zu gewinnen. Ein detailliertes mechanistisches Verständnis des katalytischen Prozesses und damit einhergehend die Steuerung der komplexen Dynamik in biochemischen Systemen sind wichtige Herausforderungen in der gegenwärtigen Biotechnologieforschung.

### **2.1.1. Der enzymkatalytische Prozess**

So unterschiedlich die natürliche Funktion der Enzyme ist, so verschieden sind auch die Mechanismen des katalytischen Prozesses. Enzymatische Reaktionen bestehen aus einer Vielzahl einzelner Reaktionsschritte. [Callender und Dyer, 2006; Zhong, 2007]



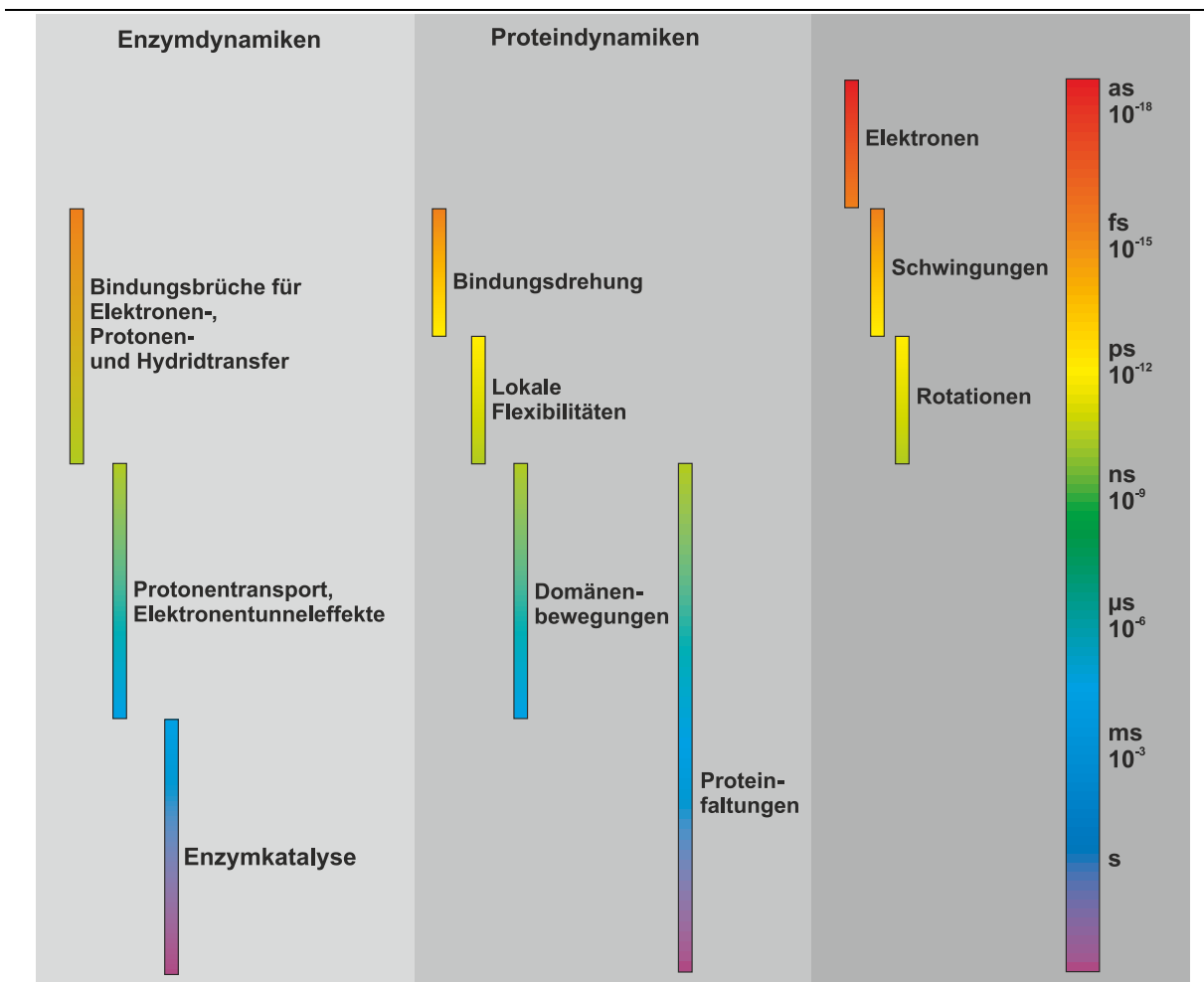
Zusammenfassend für alle Enzyme, unabhängig vom Mechanismus, kann der Zyklus der Reaktion wie folgt stark vereinfacht beschrieben werden (vgl. Abbildung 4) [Lienhard, 1973; Schramm, 1998]:  $E + S \rightleftharpoons E \cdot S \rightleftharpoons [E \cdot S]^{\ddagger} \rightleftharpoons E \cdot P \rightleftharpoons E + P$ . Die Charakterisierung des Katalysezykluses über diskrete, aufeinanderfolgende Zustände wird durch die Theorie des Übergangszustandes beschrieben. Die einzelnen Zustände sind dabei über Energiebarrieren voneinander getrennt und die Reaktionsrate steht in direkter Beziehung zur Differenz der freien Enthalpie des Grundzustandes und des Übergangszustandes (der freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^{\ddagger}$ ) (Abbildung 4). [Eyring, 1935; Lienhard, 1973] Die Beschleunigung der Reaktionsrate beruht dabei auf der Senkung dieser freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta\Delta G^{\ddagger}$  im Vergleich zur nicht-katalysierten Reaktion. Dies erfolgt über die Ausbildung mehrerer diskreter Zustände mit geringeren Energiebarrieren. [Schramm, 1998, 2011]



**Abbildung 4.** Reaktionsprofil der freien Enthalpie für eine nichtkatalysierte Reaktion (schwarz) im Vergleich zur enzymkatalysierten Reaktion (rot) nach der Theorie des Übergangszustandes [Lienhard, 1973]

Zunächst kommt es durch Bindung des Substrates S an das Enzym E zur Entstehung des sogenannten Enzym-Substrat-Komplexes ES. Dieser wird in einem nächsten Schritt in den aktivierten Zustand überführt. Aus diesem aktivierten Zustand heraus erfolgt die Umsetzung des Substrates zum Produkt und anschließend der Austritt des Produktes aus dem Enzymkomplex. Das Enzym steht nun einem neuen Katalysezyklus bereit. [Lienhard, 1973; Stryer L. *et al.*, 2002] Die Beschreibung des katalytischen Prozesses über diese diskreten Übergangszustände stellt allerdings nur eine Näherung des realen Ablaufes dar. So verläuft die Umsetzung des Enzym-Substrat-Komplexes zum Enzym-Produkt-Komplex oftmals über viele Prozessschritte, die in sehr kurzen Zeitregimen ablaufen. [Fersht, 1999] Gängige kinetische Untersuchungen vereinen häufig diese Zwischenschritte und analysieren den katalytischen Umsatz im Bereich von Millisekunden bis Sekunden.

Hier finden die dynamischen Konformationsprozesse im Enzym, die mit der Umsetzung der Substrate einhergehen keine Beachtung. Die meisten beobachteten Effekte im biokatalytischen Prozess sind jedoch auf Strukturänderungen im Picosekunden-Bereich im Enzym zurückzuführen. [Gutfreund, 1995] Abbildung 5 gibt einen Überblick über mögliche im Katalysezyklus relevante Prozesse und deren zeitliche Ausdehnung.



**Abbildung 5.** Schematische Übersicht über die Zeitskalen relevanter Prozesse in der Enzymkatalyse; [Kao *et al.*, 2007] nachempfunden

Zu diesen dynamischen Prozessen zählen Bindungsschwingungen im Femtosekunden-Bereich, Seitenkettenrotationen an der Proteinoberfläche im Pikosekunden-Bereich, Domänenbewegungen im Pikosekunden- bis Nanosekunden-Bereich, sowie Seitenkettenrotationen im Inneren des Proteins im Bereich von Mikrosekunden. [Hammes-Schiffer und Benkovic, 2006] Erst die Berücksichtigung dieser Strukturänderungen innerhalb des Katalysezykluses führt zum komplexen Gesamtbild des Katalysevorganges. [Karplus, 2000; Eisenmesser *et al.*, 2002; Hammes-Schiffer und Benkovic, 2006; Olsson *et al.*, 2006; Villali und Kern, 2010]

Es bleibt jedoch festzustellen, das für viele Enzyme Teile innerhalb des katalytischen Zykluses und das Zusammenspiel von dynamischen Prozessen im Enzym und ihrer katalytischen Funktion nicht oder nur unzureichend erforscht sind. Das macht den Einsatz einer Echtzeitanalytik erforderlich um ein tieferes Verständnis der katalytischen Funktion der Enzyme zu gewinnen.

### 2.1.2. Saure Phosphatasen

Phosphatasen sind als Hydrolasen in die EC-Klasse 3 einzuordnen und katalysieren die Spaltung von Phosphateestern zu Phosphat und dem korrespondierenden Alkohol. Klassisch erfolgt die Einteilung der Phosphatasen nach ihrem pH-abhängigen Wirkungsoptimum in saure und alkalische Phosphatasen. Saure Phosphatasen (APasen, acid phosphatases) zeigen ein ubiquitäres Vorkommen in allen lebenden Systemen. [Duff *et al.*, 1994; Anand und Srivastava] So findet man sie in vielen Zellbestandteilen, wie z. B. in Zellwänden, Vakuolen oder dem Phloem verschiedener Pflanzen. So unterschiedlich ihr Vorkommen ist, so hoch ist auch die Diversität in Bezug auf ihre biologische Funktion, ihr Substratspektrum, das Molekulargewicht, die DNA-Sequenz und Struktur. [Duff *et al.*, 1994; Bull *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008] Abbildung 6 gibt einen Auszug über eine mögliche Einteilung der Phosphatasen hinsichtlich ihrer Charakteristika.

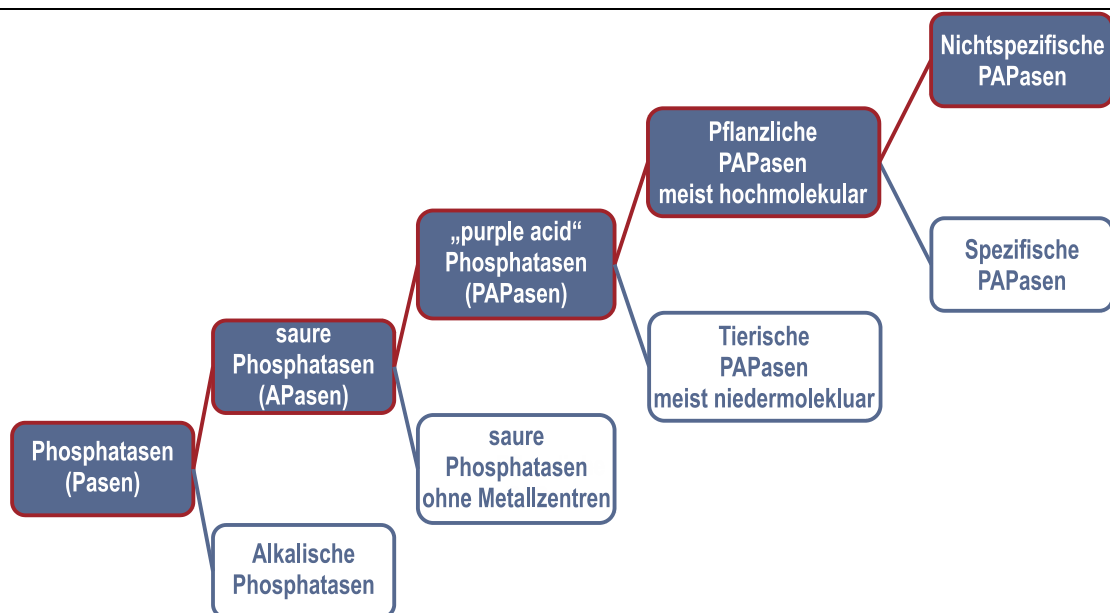


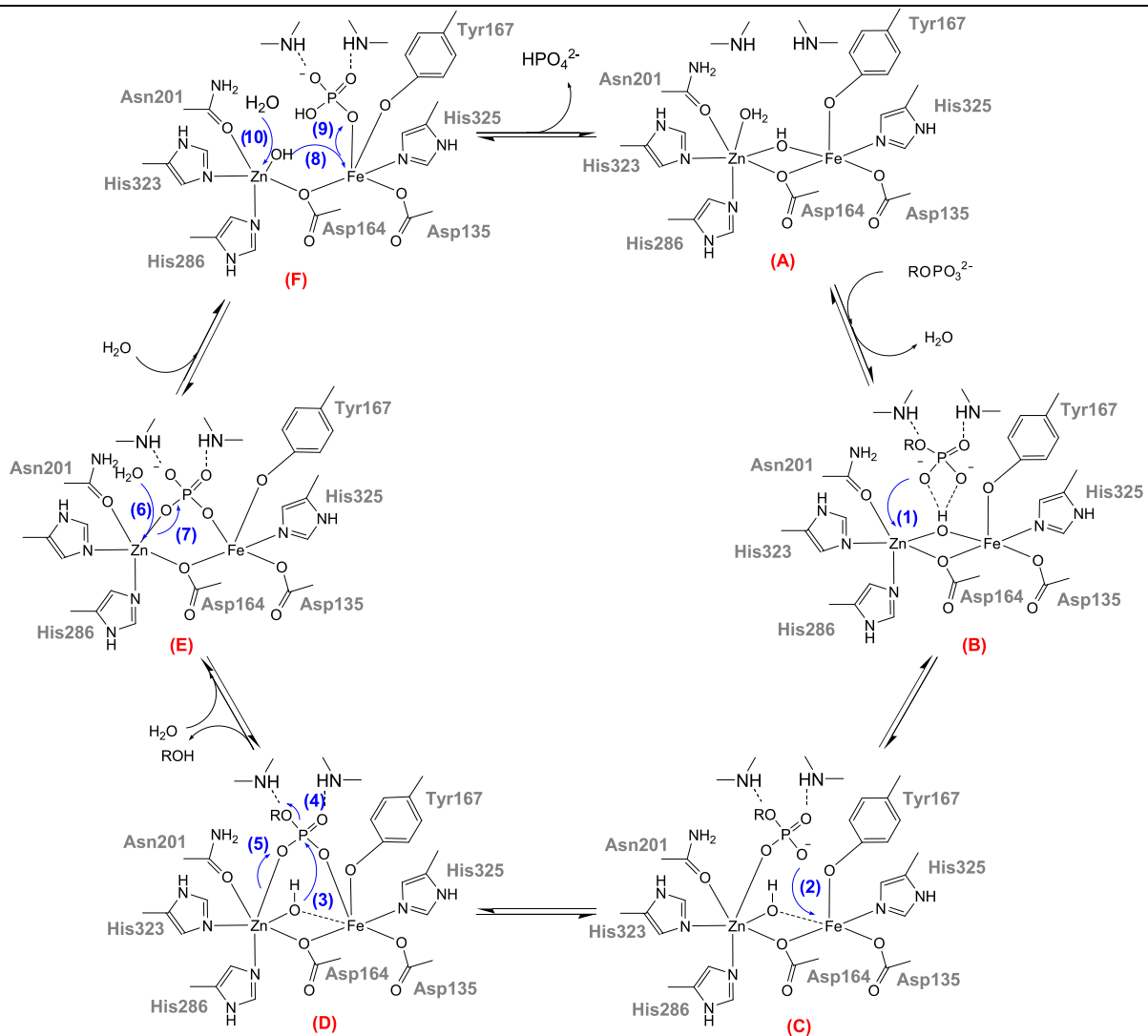
Abbildung 6. Einteilung der Phosphatasen

APasen kann man grob in pflanzliche und tierische APasen unterteilen. In beiden Kategorien gibt es verbreitet Phosphatasen, die im aktiven Zentrum zwei Metallzentren besitzen, von denen eines ein Eisenzentrum ist. [Schenk *et al.*, 2013]

Diese werden, aufgrund ihrer charakteristischen Farbe, als „purple“ also lila-farbene Phosphatasen (PAPasen) bezeichnet. Tierische PAPasen sind dabei eher niedermolekular, während pflanzliche PAPasen hochmolekular sind. [Anand und Srivastava, 2012] Unabhängig vom aktiven Zentrum können pflanzliche APasen, in Abhängigkeit ihrer Funktion, in spezifische und unspezifische Phosphatasen eingeteilt werden. Dabei bezieht sich die Spezifität auf die Akzeptanz verschiedener Substrate. Während einige APasen, wie z. B. die 3-P-Glycerate Phosphatase, eine starke aber nicht absolute Substratspezifität aufweisen, zeigen andere APasen keine bis sehr geringe Präferenzen für bestimmte Substrate. [Duff *et al.*, 1994]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Enzymaktivierung die saure Phosphatase (Typ IV-S) aus der Kartoffelknolle verwendet. Daher soll im Folgenden die Phosphatase eingeordnet und hinsichtlich ihrer Eigenschaften vorgestellt werden. Die saure Phosphatase aus der Kartoffelknolle gehört zu den unspezifischen APasen. [Alvarez, 1962] Wie die meisten pflanzlichen APasen kann sie mit rund 100 kDa (für die native Form) [Kubicz, 1973] den hochmolekularen Phosphatasen zugeordnet werden. Es ist dabei bekannt, dass sie in bis zu sechs Isoformen vorkommt, die die gleiche molekulare Masse besitzen, sich aber in der Proteinsequenz und daraus resultierend der Ladung unterscheiden. [Kubicz *et al.*, 1974] In der Literatur wurde bereits für das Isoenzym Typ II aus der Kartoffelknolle die Existenz von Metallzentren im aktiven Zentrum der APase publiziert. [Rane *et al.*, 2009] Für das hier verwendete Isoenzym Typ IV-S wurde jedoch eine derartige Zuordnung in der Literatur bislang nicht getroffen. Zudem weist die APase aus der Kartoffel keine für die PAPasen charakteristischen Absorptionsbande auf. Durch eigene Messungen (siehe Abschnitt 6.5.4) konnte jedoch ein Eisengehalt von 0,24 µg/mg Lyophilisat nachgewiesen werden.

Bereits 1962 stellte Alvarez einen vermuteten Reaktionsmechanismus für die APase aus der Kartoffel auf [Alvarez, 1962] welcher auf drei ionisierbaren Gruppen im aktiven Zentrum basiert. Dieser Mechanismus stützt sich auf eine ionisierte Carboxygruppe (die vermutlich zu einem Glutamat- oder Aspartatrest gehört), ein Imidazolzentrum (vermutlich eines Histidinrestes) und dem Monoanion eines Phosphatrestes. Ein abschließender Beweis oder eine Unterstützung dieser Theorie erfolgte in der Literatur jedoch nicht. Vergleicht man den dort postulierten Mechanismus mit literaturbekannten, so folgt er dem sauren Histidinphosphatasen. [Rigden, 2008] Bei Zuordnung der sauren Phosphatase aus der Kartoffel zu den „purple acid“ Phosphatasen kann für das verwendete Enzym der in Abbildung 7 dargestellt Mechanismus angenommen werden. [Schenk *et al.*, 2008]



**Abbildung 7.** Postulierter Mechanismus der „purple acid“ Phosphatasen basierend auf Untersuchungen der Phosphatase aus *Phaseolus vulgaris* [Schenk *et al.*, 2008]

Im Ausgangszustand liegen im aktiven Zentrum des Enzyms beide Metallzentren  $\mu$ -verbrückt vor (A). Durch den Eintritt des Substrates und gleichzeitigen Austritt des enthaltenen Wassers wird ein präkatalytischer Komplex (B) erhalten, in dem der Phosphatester noch nicht an die Metallzentren koordiniert. In einem ersten Schritt des Katalysezyklus koordiniert der Phosphatrest über ein Sauerstoffatom an das erste Metallzentrum (1) und anschließend auch an das Eisenzentrum (2). Es kommt zur Ausbildung eines verbrückten  $\mu$ -1,3-Substratkomplexes (D). Diese Zustände werden durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit vorhandenen Histidinresten stabilisiert. [Olczak *et al.*, 2003] Im Anschluss daran erfolgt der nucleophile Angriff der  $\mu$ -verbrückten Hydroxygruppe auf das Phosphoratom (3) unter gleichzeitigem Austritt des Alkohols (4). In einem nächsten Schritt erfolgt der nucleophile Angriff zweier Wassermoleküle. Es kommt sequentiell zur erneuten Verbrückung beider Metallzentren (8), zum Austritt des Phosphatrestes (9) und zur Koordination eines Wassermoleküles (10). Das Enzym steht nun einem neuen Katalysezyklus zur Verfügung. [Schenk *et al.*, 2008]

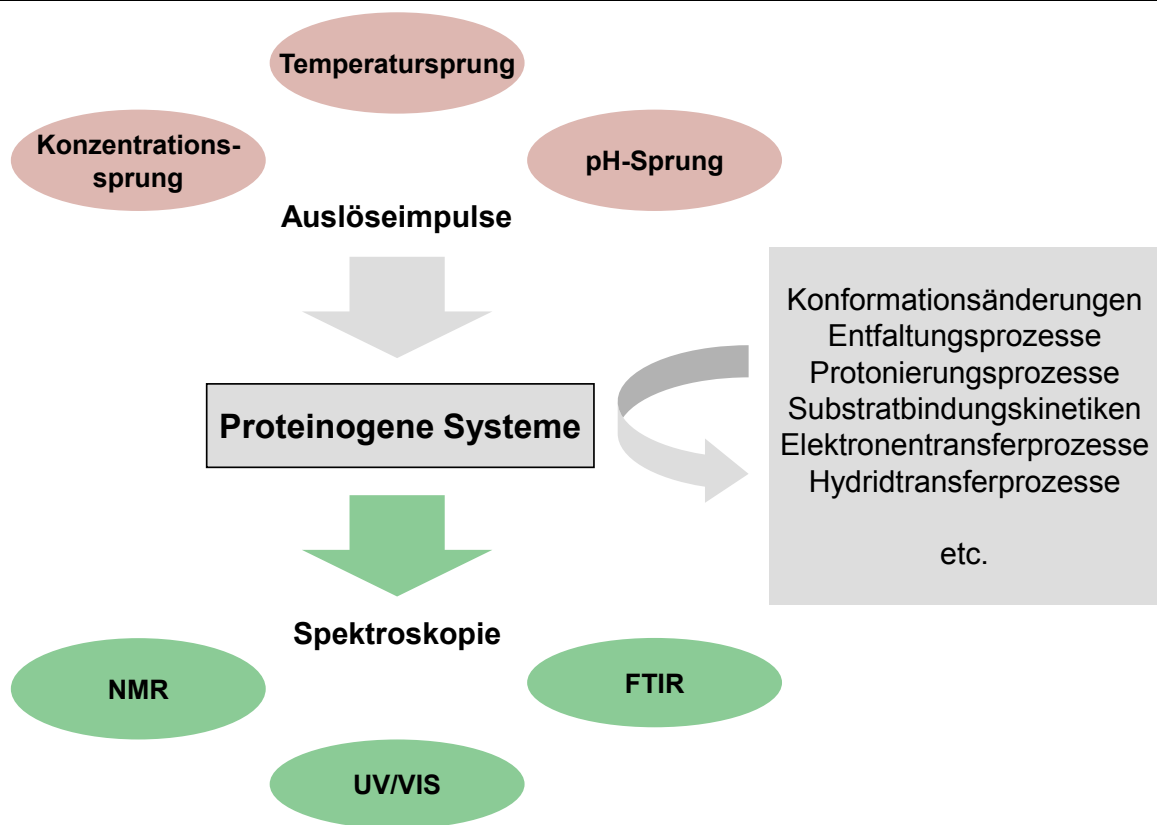
## **2.2. Sprungverfahren zur externen Steuerung von enzymatischen Reaktionen**

Die Natur ist ein Vorbild für die externe, optische Steuerung von Prozessen. Viele enzymatische Prozesse in der Natur sind lichtinduziert bzw. lichtgesteuert. Eines der prominentesten Beispiele ist die Photosynthese. [Olson und Blankenship, 2004] Aber auch weitere Prozesse wie z. B. die Serotonin- bzw. Melatoninproduktion oder der Sehprozess sind an dieser Stelle zu nennen. [Wald, 1968; Klein, 2007; Kiser *et al.*, 2012] Die Verwendung von Licht als Auslöseimpulse für die externe Kontrolle enzymatischer Funktionen bietet einige Vorteile. [Mayer und Heckel, 2006; Gorostiza und Isacoff, 2008]

- i. Aufgrund der Abwesenheit von Chromophoren, absorbieren die meisten Zellen kein Licht (mit Ausnahme von Photorezeptoren).
- ii. Bei geeigneter Wahl der Wellenlänge werden Enzyme in ihrer biologischen Funktion nicht beeinträchtigt.
- iii. Licht kann als Trigger mit einer enorm hohen Zeitauflösung eingesetzt werden.
- iv. Zusätzlich besitzt es den Vorteil einer hohen örtlichen Auflösung.

Im Folgenden werden einige Studien bereits erfolgreich durchgeführter Sprungexperimente vorgestellt, wobei die Einführung der sprunghaften Änderungen auf die lichtinduzierte Steuerung beschränkt wird. Sprungmethoden, als Form der Relaxationsmethoden, dienen zur Untersuchung schneller Reaktionen bzw. Teilreaktionen. Bei dieser Form der kinetischen Analyse werden durch externe Auslöseimpulse die Umgebungsbedingungen innerhalb eines Systems sprunghaft geändert. Das bedeutet es werden instantan reaktionsrelevante Umgebungsparameter, wie die Temperatur, der pH-Wert oder die Reaktandenkonzentration geändert. Als Reaktion auf das Triggersignal und die resultierenden, veränderten Phasenbedingungen kommt es zur Neueinstellung des chemischen Gleichgewichtes. [Gutfreund, 1995; Fersht, 1999] Die Zeitauflösung mit der die externe Steuerung der Umgebungsvariablen realisiert wird, bestimmt das Zeitregime, in dem Prozesse beobachtet werden können.

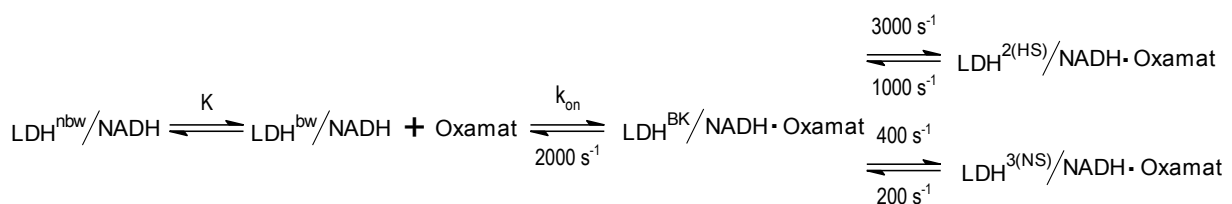
In Abbildung 8 wird graphisch das Prinzip der Sprungmethode für die Untersuchungen schneller Prozesse in proteinogenen Systemen veranschaulicht. In der Analyse proteinogener Systeme wurden bislang vorrangig Temperatur-, Konzentrations- und pH-Sprungexperimente angewendet. [Callender und Dyer, 2006] Diese Auslöseimpulse resultieren dann in Prozessen, wie z. B. Faltungs-, Protonierungs- oder anderen Transferprozessen. Erfolgt die Einführung der Prozesse schneller als das Zeitregime in dem sie stattfinden, können sie durch Detektionsmethoden mit entsprechender Zeitauflösung in Echtzeit untersucht werden. Dabei gibt es vielfältige Möglichkeiten der Detektion, von denen hier exemplarisch nur wenige dargestellt werden.



**Abbildung 8.** Sprungverfahren für die Untersuchung enzymatischer Prozesse

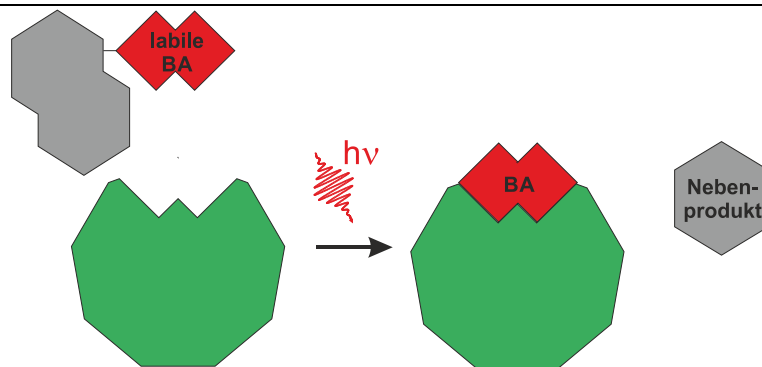
Die Verwendung von Temperatursprüngen in kinetischen Untersuchungen stellt die einfachste und vielseitigste der Sprungmethoden dar. [Callender und Dyer, 2006] Ein Vorteil der Methode ist, dass sie ohne die Zugabe weiterer Reagenzien auskommt und in der Theorie ubiquitär einsetzbar ist. Beispielhaft für diese Technik wird an dieser Stelle die Untersuchung des Reaktionspfades der Lactatdehydrogenase beschrieben. [Deng *et al.*, 2001; McClendon *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008] Deng *et al.* berichteten 2001 den Einsatz von Temperatur-Sprungstudien für die Untersuchung der Bindung des Cofaktors NADH an die Bindungsstelle der Lactatdehydrogenase. Innerhalb dieser Studie konnte gezeigt werden, dass neben der Enzym-Ligand-Begegnung im Bereich von 290  $\mu$ s, zusätzlich weitere Relaxationszeiten im Bereich von 200 ns bis 24  $\mu$ s existieren, die in Echtzeit detektiert werden konnten. [Deng *et al.*, 2001] Es wird vermutet, dass diese aus weiteren Strukturen stammen, die aus dem Bindungsprozess hervorgehen. Dadurch wird die Annahme unterstützt, dass neben dem gebundenen und dem ungebundenen Zustand weitere maßgebliche Spezies unterschiedlicher Strukturen existieren, die miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht stehen. In darauf folgenden Untersuchungen wurde die Bildung des Michaelis-Menten Komplexes untersucht. [McClendon *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2007]

In Abbildung 9 ist zur Veranschaulichung ein vereinfachter Reaktionspfad abgebildet. Nachfolgend zur Cofaktor-Komplexbildung existieren für die weitere Bindungsbildung mehrere Strukturen, von denen nur eine bindungswirksam ist. [Deng *et al.*, 2008] Der Komplex existiert in 3 verschiedenen Spezies, die in einem dynamischen Gleichgewicht stehen. Dabei kommt es während des Zykluses der Substratumsetzung durch Strukturänderungen zu einer Vielzahl unwirksamer Übergangszustände (ähnlich  $\text{LDH}^{3(\text{NS})}/\text{NADH}$ ), die normalerweise sehr schnelllebig sind und zugunsten des wirksamen Bindungskomplexes ( $\text{LDH}^{2(\text{HS})}/\text{NADH}$ ) unterdrückt werden. Somit ist diese Studie ein ausgezeichnetes Beispiel für das Funktionsprinzip der sogenannten induced fit-Theorie [Horton H. R. *et al.*, 2008].



**Abbildung 9.** Reaktionsschema der Bindungsbildung für die Lactatdehydrogenase [Deng *et al.*, 2008] (nbw = nicht bindungswirksam; bw = bindungswirksam; BK = Bindungskomplex; HS = Hauptstruktur; NS = Nebenstruktur)

Neben dem Einsatz der Temperatursprungmethode dient auch die Erzeugung eines sprunghaften Konzentrationsgradienten der kinetischen Untersuchung und Steuerung enzymatischer Reaktionen. Bereits 1978 veröffentlichte Kaplan seine Arbeit zur Freisetzung von ATP, durch die er die Hydrolyse der Na,K-ATPase steuern konnte. [Kaplan *et al.*, 1978] Diese Arbeit gilt als Grundstein für den Einsatz sogenannter photolabiler Schutzgruppen, auf die eine Vielzahl an Studien durch die Einführung sprunghafter Konzentrationsgradienten folgte. [Pelliccioli und Wirz, 2002] Dabei stellen biologisch aktive Verbindungen wie z. B. ATP, cAMP oder Glutamat die Abgangsgruppe einer photolabilen Verbindung (vgl. Abbildung 10) dar.



**Abbildung 10.** Funktionsprinzip photolabiler Schutzgruppen (BA = bioaktive Verbindung) zur Erzeugung eines sprunghaften Konzentrationsgradienten; [Specht 2009] nachempfunden



Solange die photolabile bioaktive Substanz gebunden ist, hat er auf die Funktion der Proteine keinen Einfluss. Durch photolytische Anregung wird eine sprunghafte Freisetzung der Verbindung erreicht, die in der Konsequenz zu einer einsetzenden, erhöhten oder verminderten Proteinfunktion führt. [Specht *et al.*, 2009] Einer der häufigsten, in biologischen Systemen auftretenden Botenstoffe ist L-Glutamat. [Mayer und Heckel, 2006] Als wichtiger Neurotransmitter wird er vielfach als Auslöseimpuls für die Steuerung neuronaler Strukturen zur Untersuchung ihrer Funktionen eingesetzt. [Callaway und Yuste, 2002] Hier soll, aufgrund der Vielzahl an bekannten Studien, nur exemplarisch eine der ersten Untersuchungen zur Stimulierung von Dendriten durch Kandler *et al.* und Dodt *et al.* beschrieben werden. Dendriten sind Fortsätze der Nervenzellen, die der Signalaufnahme und -weiterleitung dienen. [Biologie-Lexikon] Kandler *et al.* berichteten die gezielte Freisetzung von Glutamat entlang der Dendriten von CA1 Pyramidenzellen des Hippocampus um eine externe Steuerung der Funktion der Glutamatrezeptoren zu erzielen. [Kandler *et al.*, 1998] Untersuchungen zum Hippocampus haben vor allem ein vertieftes Verständnis der neuronaler Prozesse bei Lernvorgängen zum Ziel. Es wird dabei angenommen, dass Formen der synaptischen Plastizität wie Langzeitdepressionen (eine anhaltende Schwächung der synaptischen Übertragung) oder Langzeitpotenzierungen (eine anhaltende Erhöhung der synaptischen Übertragung) wesentliche Prozesse des Lernens sind. [Malenka, 1994] Dabei wurde der Ursprung dieser Prozesse lange diskutiert. [Dodt *et al.*, 1999] Kandler *et al.* konnten resultierend aus dem Konzentrationssprung des Neurotransmitters Glutamat eine Langzeitdepression in den Synapsen als postsynaptischen Effekt lokalisieren. Auch Studien von Dodt *et al.* führten zu dem Ergebnis, dass die Langzeitdepression der Glutamatrezeptoren auf einen postsynaptischen Mechanismus zurückzuführen ist. [Dodt *et al.*, 1999] Die Entwicklung der Triggersubstrate in der aktuellen Forschung geht dahin, photolabile Schutzgruppen zu synthetisieren, die durch Zweiphotonenanregung freigesetzt werden können. Dies ermöglicht die Erzeugung eines Konzentrationssprunges von bioaktiven Molekülen ohne den Einsatz energiereicher UV-Strahlung. Darüber hinaus wird durch den Einsatz von Strahlung im nahen IR-Bereich die Streuung des Anregungslichtes verringert. [Bort *et al.*, 2013]

Die Einführung eines pH-Sprunges in biologischen oder biochemischen Systemen kann strenggenommen auch als Konzentrationssprung betrachtet werden. Denn im Grunde handelt es sich bei der pH-Sprungmethode um die sprunghafte Erhöhung bzw. Erniedrigung der Hydroniumionenkonzentration. Die Initiierung eines pH-Sprunges kann über eine Vielzahl photolabiler Verbindungen erreicht werden, die in Abschnitt 2.2.1 ausführlicher beschrieben werden. In diesem Abschnitt soll die Anwendung dieses Sprungverfahrens in kinetischen Untersuchungen dargestellt werden.

Bereits 1979 zeigten Gutman und Huppert die laserinduzierte Protonenfreisetzung durch die Verwendung von Naphtholsulfonaten und diskutierten die zukünftige Anwendung in biochemischen oder biophysikalischen Studien. [Gutman und Huppert, 1979]

Hierbei wurden sogenannte Photosäuren (vgl. Abschnitt 2.2.1) verwendet, durch die ein reversibler pH-Sprung realisierbar ist. Mit Hilfe dieser Technik wurden noch weitere Studien zur Untersuchung von Protonentransferprozessen in proteinogenen Systemen durchgeführt. [Marantz *et al.*, 2001; Schätzler *et al.*, 2003; Sahu *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2011] Eine weitere Möglichkeit ist die Erzeugung eines permanenten pH-Sprunges in Reaktionssystemen. [Viappiani *et al.*, 1998b] Diese Technik hat sich vor allem für die Untersuchung von Faltungsstudien durchgesetzt. Hier waren es überwiegend Arbeiten der Gruppe um Viappiani und später auch Abbruzzetti, die mit Hilfe des persistenten pH-Sprunges kinetische Proteinstudien veröffentlichten.

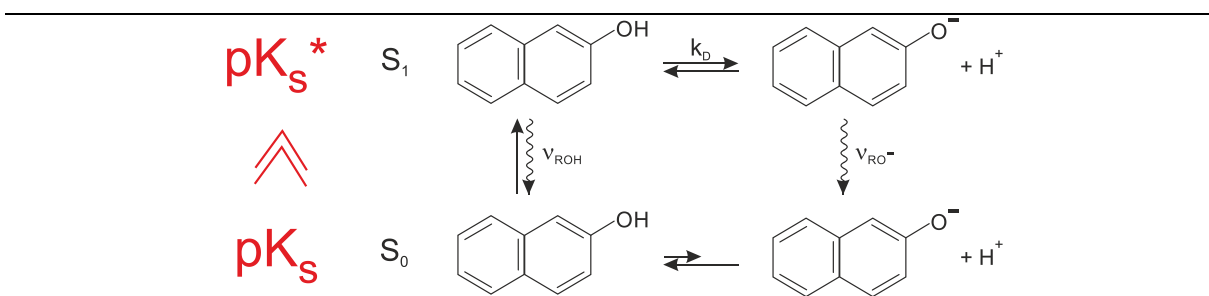
2001 berichteten Abbruzzetti *et al.* den erfolgreichen Einsatz des laserinduzierten pH-Sprunges zur Untersuchung schneller Protonierungsereignisse während der Entfaltung von Apomyoglobin. [Abbruzzetti *et al.*, 2000a] Als Reaktion auf die sprunghafte Protonenfreisetzung konnten zwei parallele Protonierungsprozesse identifiziert werden: Zum einen die Protonierung von Carboxylatgruppen und zum anderen die Protonierung der vorhandenen Histidinreste His24 und His119, auf welche der eintretende Entfaltungsprozess zurückgeführt werden konnte. Photoakustische Messungen lieferten für die Protonierung der Histidinreste Geschwindigkeitskonstanten von  $7,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und daraus resultierende frühe Strukturänderungen mit einer Konstante von  $6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Für die Carboxylatgruppe wurde eine Geschwindigkeitskonstante von  $1,25 \cdot 10^{-11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ermittelt.

In einer späteren Studie zeigten Abbruzzetti *et al.* für Myoglobin, dass mit Hilfe der durch die pH-Sprungstudie gewonnenen Daten eine präzise und vollständige Abbildung der Kinetik des Entfaltungsprozesses möglich ist. [Abbruzzetti *et al.*, 2006b] Die Anwendung des laserinduzierten pH-Sprunges für die Verfolgung von Entfaltungsereignissen konnte auch für das Cytochrom C erfolgreich gezeigt werden. [Abbruzzetti *et al.*, 2001; Abbruzzetti *et al.*, 2004] Hier konnten erfolgreich die kinetische Verfolgung der Dissoziation von Histidinseitenketten und Häm-Liganden dokumentiert werden.

Obwohl eine Vielzahl von pH-Sprungreagenzien für die Erzeugung eines permanenten pH-Sprunges bekannt sind [Pelliccioli und Wirz, 2002; Callender und Dyer, 2006; Shi *et al.*, 2011; Klan *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2013], ist ihre Anwendung in biochemischen Studien noch immer eher selten. [Rosell und Mauk, 2011] Diese Technik ist aber vorwiegend auf den Einsatz in Proteinfaltungsstudien und für Untersuchungen von Ligandenbindungskinetiken beschränkt.

### 2.2.1. pH-Sprung-Reagenzien

Eine pH-Wert-Kontrolle ist neben der lichtinduzierten Steuerung auch über Mikromischsysteme möglich. Diese Systeme sind allerdings beschränkt auf das Zeitfenster von wenigen Mikrosekunden. [Chan *et al.*, 1997; Jeong *et al.*, 2010] Darüber hinaus sind sie im Vergleich mit der lichtinduzierten Kontrolle des pH-Wertes auch in ihrer örtlichen Auflösung eingeschränkt. An dieser Stelle wird daher der Einsatz der optischen pH-Wert Steuerung näher vorgestellt. Für die sprunghafte Freisetzung an Protonen existiert eine Vielzahl an Verbindungen, die in zwei Klassen eingeteilt werden können. Zum einen handelt es sich um Verbindungen, durch deren Anregung ein reversibler pH-Sprung erzeugt wird. Zum anderen geht es um Verbindungen durch deren photolytische Umsetzung der pH-Wert permanent verändert wird. Verbindungen durch deren lichtinduzierte Anregung ein reversibler pH-Sprung realisierbar ist, sind sogenannte Photosäuren. [Arnaut und Formosinho, 1993; Tolbert und Solntsev, 2002; Agmon, 2005] Das sind Strukturen, deren  $pK_s$ -Wert sich im Grundzustand deutlich vom  $pK_s^*$ -Wert im angeregten Zustand unterscheidet (Abbildung 11). Durch photolytische Anregung wird die Photosäure aus dem Grundzustand in den angeregten Zustand überführt. Als Konsequenz des stark herabgesetzten  $pK_s$ -Wertes im angeregten Zustand erfolgt die Protonenfreisetzung mit der durch  $k_D$  beschriebenen Geschwindigkeit. [Agmon, 2005] Durch Rückkehr in den Grundzustand kommt es zur Rekombination und der pH-Wert des Grundzustandes wird wieder hergestellt. In Abbildung 11 wird der Prozess der Protonenfreisetzung durch Anregung veranschaulicht.



**Abbildung 11.** Lichtinduzierte, reversible Protonenfreisetzung durch Anregung von Photosäuren; [Agmon, 2005] nachempfunden

Neben den Hydroxynaphtholen ist 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat (HPTS) eine der populärsten Photosäuren. [Tolbert und Solntsev, 2002] HPTS besitzt in wässrigen Systemen eine für Photosäuren typische Rekombinationszeit im ps-Bereich. [Arnaut und Formosinho, 1993] Diese wurde unter anderem in den bereits erwähnten Studien von Gutman, Marantz, Schätzle verwendet. Eine dagegen eher langlebige Photosäure stellt das 1-(2-Nitroethyl)-2-naphthol dar. [Nunes *et al.*, 2009] Seine photolytischen Eigenschaften wurden erst kürzlich durch Nunes *et al.* untersucht, wobei sich eine Rekombinationszeit von einer Sekunde zeigte.

Somit stehen durch die Anwendung dieser Photosäure auch langlebigere pH-Sprünge zur Verfügung. Allerdings wurde bislang für 1-(2-Nitroethyl)-2-naphthol noch keine Anwendung in biologischen Systemen berichtet.

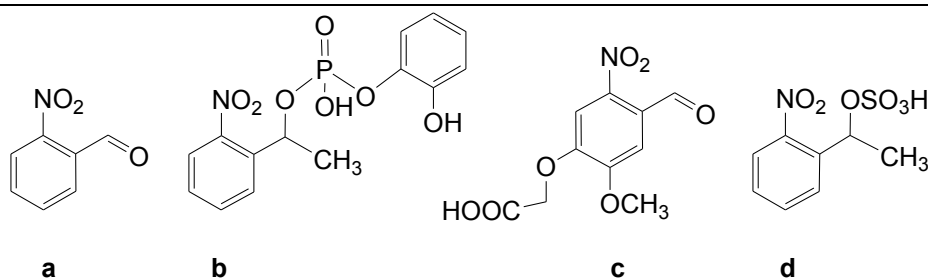
Abseits der Anwendung von Photosäuren stellt die Nutzung sogenannter photolabiler Schutzgruppen eine weitere Möglichkeit der pH-Sprungerzeugung dar. Durch die photolytische Umsetzung dieser Verbindungen werden irreversibel Protonen freigesetzt. Eine wichtige Gruppe von photolabilen pH-Sprungreagenzien sind Phenacylderivate. Hier sind es Hydroxy- oder Methoxyphenacylderivate, sowie Dimethoxyphenacylderivate, zu denen zahlreiche Studien publiziert wurden (Literatur in Tabelle 2). In Abhängigkeit von der photolabilen Abgangsgruppe, welche an die Grundstruktur gekoppelt ist, sind bei Betrachtung dieser Substrate ist eine Vielzahl an Derivaten denkbar. Um einen kleinen Überblick zu verschaffen, wird an dieser Stelle eine Auswahl von Beispielen tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 2.** Phenacylderivate zur lichtinduzierten Protonenfreisetzung

Eintrag	Triggersubstrat	Substratstruktur	Strukturen wichtiger Produkte	Referenz
1	4-Hydroxy-phenacylacetat			[Givens <i>et al.</i> , 2011]
2	4-Hydroxy-phenacyldiethyl-phosphat			[Ma <i>et al.</i> , 2009]
3	4-Hydroxy-phenacyldiphenyl-phosphat			[Ma <i>et al.</i> , 2009]
4	4-Methoxy-phenacyldiethyl-phosphat			[An <i>et al.</i> , 2010]
5	2,5-Dimethyl-phenacyl-4-toluolsulfonat			[Klan <i>et al.</i> , 2002]
6	2-Hydroxy-phenacylacetat			[Ngoy <i>et al.</i> , 2012]

Eine große Gruppe photolabiler Schutzgruppen sind 4-Hydroxyphenacylderivate (Eintrag 1-3, Tabelle 2), die nicht nur zur Freisetzung von Säuren, sondern auch von Aminosäuren oder anderen bioaktiven Verbindungen genutzt werden. [Givens *et al.*, 2011]

Für die Säurefreisetzung wurden dabei hauptsächlich der Essigsäureester (Eintrag 1), sowie die in Tabelle 2 dargestellten Phosphatester (Eintrag 2-3) untersucht. [Pelliccioli und Wirz, 2002; Klan *et al.*, 2013] Ein Nachteil dieser Verbindungen ist, dass in wässriger Lösung neben der aus der Abgangsgruppe gebildeten Säure Nebenprodukte entstehen, die protonierbare Gruppen enthalten. [Givens *et al.*, 2011] Unter Umständen sind die Säurekonstanten dieser Nebenprodukte größer als die der freien Abgangsgruppe. Dadurch kann eine erhöhte Pufferkapazität entstehen, die eine Limitierung des pH-Sprunges zur Folge hat. Ein ähnliches Problem besteht auch bei den vorgestellten Methoxy-, sowie 2,5-Dimethylphenacyl-Derivat (Eintrag 4 und 5). Dies könnte ein möglicher Grund für den fehlenden Einsatz in biologischen pH-Sprungsystemen sein. Anders verhält es sich bei dem dargestellten 2-Hydroxyphenacylacetat (Eintrag 6). Hier kommt es neben der Freisetzung der Essigsäure zur Bildung von 2(3H)-Benzofuranon sowie 3(2H)-Benzofuranon. [Ngoy *et al.*, 2012] Da beide Verbindungen keine protonierbaren Gruppen besitzen, entscheidet allein der  $pK_s$ -Wert der Abgangsgruppe über den realisierbaren pH-Sprung. Diese Verbindungen sind zwar in biologischen Systemen noch nicht getestet worden, bieten aber innerhalb der Phenacylderivate das größte Potenzial für weitere Anwendungen.



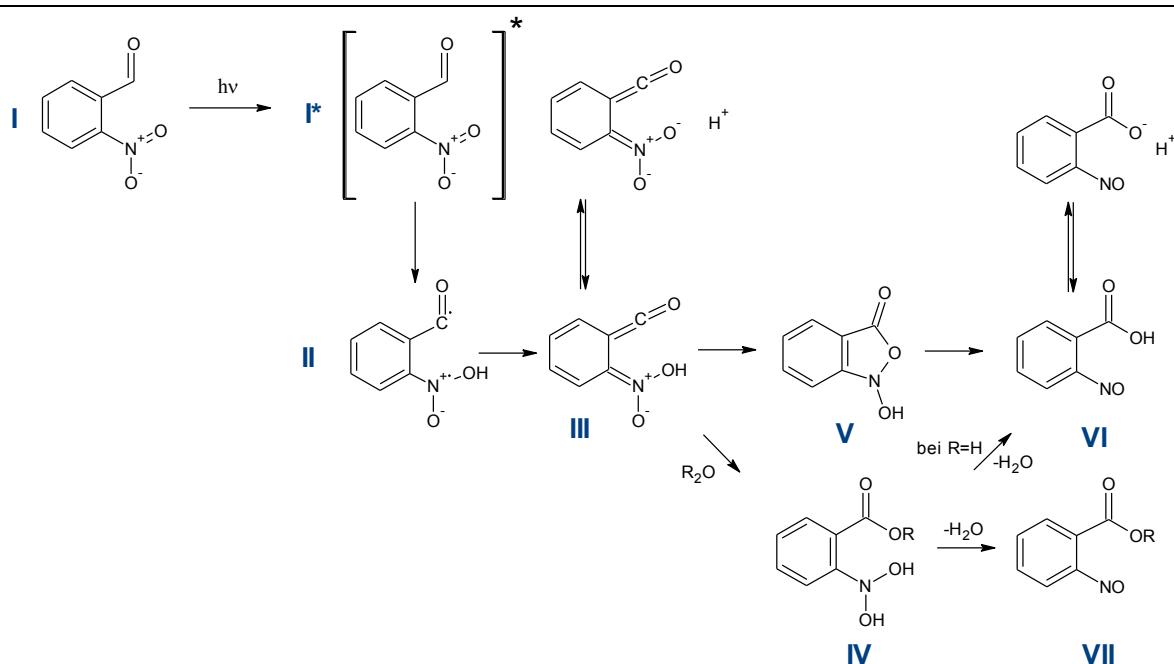
**Abbildung 12.** 2-Nitrobenzyl-derivate zur photolytischen Protonenfreisetzung [Barth und Corrie, 2002]

Die gebräuchlichsten Vertreter für irreversible Freisetzungen photolabiler Schutzgruppen sind 2-Nitrobenzylverbindungen. [Pelliccioli und Wirz, 2002] Häufig wird dabei für die Protonenfreisetzung in wässrigen biochemischen Systemen 2-Nitrobenzaldehyd als pH-Sprung-Reagenz eingesetzt (Abbildung 12 a). Die photolytische Umsetzung von 2-Nitrobenzaldehyd ist bereits seit 1901 bekannt. [Ciamician und Silber, 1901] Für diese Verbindung wurden bereits zahlreiche Studien über den Mechanismus der Umsetzung, das Zeitregime der Freisetzung und die Kinetik der photolytischen Umsetzung durchgeführt. [George und Scaiano, 1980; Abbruzzetti *et al.*, 2003; Abbruzzetti *et al.*, 2004; Laimgruber *et al.*, 2005; Abbruzzetti *et al.*, 2006b; Heinz *et al.*, 2008; Laimgruber *et al.*, 2008; Donten *et al.*, 2011] Diese Untersuchungen werden detaillierter im nächsten Abschnitt beschrieben.

Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe ist das 2-Hydroxyphenyl-1-(2-nitrophenyl)ethylphosphat (HP-NPE-Phosphat, Abbildung 12 b). Anfang der 90er Jahre berichteten Khan *et al.* von der Synthese und der Charakterisierung dieses 2-Nitrophenylderivates. [Khan *et al.*, 1993] Das Ziel war der Einsatz dieses pH-Sprungreagenzes in Kombination mit einem Serin-freisetzenden Reagenz, um die bakterielle Chemotaxis zu untersuchen. Dafür wurde HP-NPE-Phosphat hinsichtlich seines pH-Sprungsverhaltens untersucht. Mit einem Absorptionsmaximum von 270 nm eignet es sich für eine Anregung im UV-Bereich von 300 bis 350 nm. Die Anregung in dieser Studie erfolgte mit einem XeCl-Laser führte zu einer sprunghaften Protonenfreisetzung in einem Zeitregime von etwa 5  $\mu$ s. Dabei wurde für die Protonenfreisetzung eine Quantenausbeute von 0,28 ermittelt. Ausgehend von einem pH-Wert von 8 konnte durch Einzelpulsanregung eine Erniedrigung des pH-Wertes um eine pH-Einheit erzielt werden. Durch mehrmalige Anregung konnte der pH-Wert noch weiter, aber nie unter einen pH-Wert von 5 gesenkt werden. Der Grund dafür ist in dem relativ hohen  $pK_s$ -Wert (5,3) und der daraus resultierenden verminderten Dissoziation der entstehenden Säure 2-Hydroxyphenylphosphat zu sehen. Daher eignet sich das Triggersubstrat HP-NPE-Phosphat (b) lediglich für die Erzeugung geringer pH-Wertverschiebungen und ist für die Erzeugung von pH-Werten kleiner als 5 gänzlich auszuschließen. [Khan *et al.*, 1993] Darüber hinaus sind auch Untersuchungen zum Protonentransferverhalten des 4-Formyl-6-methoxy-3-nitrophenoxyessigsäure (FM-NP-Essigsäure, Abbildung 12 c) bekannt. [Janko und Reichert, 1987] Die photolytische Umsetzung der FM-NP-Essigsäure zur korrespondierenden Nitrosoverbindung (4-Carboxymethoxy-5-methoxynitrosobenzoessäure) und somit die Freisetzung von Protonen erfolgt in weniger als 1  $\mu$ s. Die entstehende Nitrosobenzoessäure besitzt eine Säurekonstante von 2,7, wodurch eine Generierung von pH-Werten im stärker sauren Bereich realisiert werden kann. Das pH-Sprungreagenz besitzt zwei Absorptionsmaxima. Das erste Maximum liegt bei 263 nm und das zweite, welches auch eine Anregung im langwelligen UV-Bereich ermöglicht, bei 345 nm. Allerdings wurde für die Protonenfreisetzung lediglich eine Quantenausbeute von 0,18 ermittelt. [Janko und Reichert, 1987] Neben den beiden länger bekannten 2-Nitrophenylderivaten gibt es auch neuere Entwicklungen. 2002 publizierten Barth *et al.* die Synthese des 1-(2-Nitrophenyl)ethylsulfat (NPE-Sulfat, Abbildung 12 d). Das Ziel der Anwendung dieses pH-Sprung-Reagenzes war der Einsatz eines Substrates, dessen Photolyse mit geringen Änderungen der IR-Absorptionen einhergeht. [Barth und Corrie, 2002] Diese Verbindung bietet neben der hohen Wasserlöslichkeit den Vorteil eines geringen  $pK_s$ -Wertes der entstehenden Schwefelsäure von 1,92 und einer Quantenausbeute von 0,47. In weiterführenden kinetischen Untersuchungen wurde eine Protonenfreisetzung innerhalb von 100 ns berichtet. [Abbruzzetti *et al.*, 2005b] Anwendung fand das NPE-Sulfat sowohl in Konformationsstudien zum Metmyoglobin [Barth und Corrie, 2002] und zum Myoglobin [Abbruzzetti *et al.*, 2006b], als auch in weiteren biochemischen Studien [Peralvarez-Marin *et al.*, 2008; Mandal *et al.*; Carbone *et al.*].

### 2.2.2. 2-Nitrobenzaldehyd als Triggersubstrat für die Erzeugung von pH-Sprüngen

Erstmals wurde die Photolyse des 2-Nitrobenzaldehydes 1901 durch Ciamician und Silber beschrieben. [Ciamician und Silber, 1901] Sie diskutierten die Umlagerung des Nitrobenzaldehydes zur Nitrosobenzoesäure oder einem entsprechenden Ester durch die Einwirkung von Licht in organischen Lösungsmitteln. Über den Mechanismus oder mögliche Anwendungen dieser intramolekularen Photoumlagerung wurde jedoch nicht berichtet. 1975 machten Filby und Gunther erste Mutmaßungen über einen möglichen Mechanismus der Umlagerung. [Filby und Gunther, 1975] Dabei nahmen sie in Übereinstimmung mit der Photolyse anderer nitroaromatischer Derivate an, dass es in einem ersten Schritt zu einer Abstraktion des Wasserstoffes am Aldehydkohlenstoff kommt, welches die Nitrofunktion protoniert. Auch die anschließende intermediäre Bildung eines Ketens (Abbildung 13, III) wurde bereits diskutiert, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 13.** Postulierter Mechanismus der photolytischen, intramolekularen Umlagerung des 2-Nitrobenzaldehydes [George und Scaiano, 1980; Laimgruber *et al.*, 2005]

Darüber hinaus erklärten sie, dass ein angeregter Triplett-Zustand für die photolytische Umlagerung verantwortlich ist. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Umlagerung wurden 1980 von George und Scaiano veröffentlicht. [George und Scaiano, 1980] Sie stellten erfolgreich die Verfolgung der Reaktion und ihrer Intermediate durch ns-aufgelöste transiente Absorptionsmessungen dar. Sie konnten für 2-Nitrobenzaldehyd und andere Nitrobenzyllderivate die Bildung intermediärer Spezies detektieren.

Sie postulierten den dargestellten Mechanismus und ordneten das transiente Signal dem Ketenintermediat (III) zu (Abbildung 13). Auch sie folgerten aus ihren Studien einen Mechanismus ausschließlich über einen angeregten Triplettzustand. Diese Annahme wurde 1989 von Yip und Sharma widerlegt, die durch Untersuchungen mit Triplettquenchern die Anwesenheit eines initialen Singulettzustandes nachweisen konnten. [Yip und Sharma, 1989] Das im Mechanismus entstehende Ketenintermediat konnte erstmals durch Kuberski et al. Anfang der 90er Jahre über Infrarotmessungen nachgewiesen werden. [Kuberski und Gebicki, 1992] Dabei nutzten sie die Methode der Matrixisolation, um auftretende Intermediate stabilisieren und detektieren zu können. So konnten erfolgreich Streckschwingungen im Bereich von 2118 und 2107  $\text{cm}^{-1}$  dem intermediären Keten zugeordnet werden. Moderne Methoden erlauben neben der Stabilisierung durch Matrixisolation auch die Echtzeitanalytik der Photolysereaktion. So kann durch experimentelle Analyse das vollständige Bild der Umlagerungsreaktion abgebildet werden. Laimgruber et al. veröffentlichten dazu eine Studie, in der eine fs-gepulste Anregung mit transientser Absorptions-, Infrarot- und stimulierter RAMAN-Spektroskopie kombiniert wurde. [Laimgruber et al., 2005] Nach der Anregung wurde innerhalb von rund 400 fs ein starker Anstieg einer IR-Bande bei 2040  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet, welche sich mit einer charakteristischen Zeit von ca. 10 ps zu 2100  $\text{cm}^{-1}$  verschiebt. Die Abklingzeit dieses Signals beträgt etwa 60 bis 90 ps. Schlussfolgernd wurde eine Umlagerung des angeregten Singulett-Zustandes des 2-Nitrobenzaldehydes ( $I^*$ ) zum Ketenintermediat (III) mit einer Zeitkonstante von 400 fs diskutiert. In einer folgenden Studie konnten Laimgruber et al. für die Bildung des intermediären Ketens zwei Reaktionswege identifizieren. [Laimgruber et al., 2008] So existiert neben der dominierenden Umlagerung des angeregten Singulett-Zustandes im Femtosekunden-Bereich, ein zweiter langsamerer Reaktionsweg ausgehend von einem angeregten Triplettzustand mit einer Zeitkonstante von 200 ps. Die weitere Umlagerung des Ketens zum Intermediat IV und V wurde für die ethanolische Lösung mit ca. 90 ps angegeben. [Laimgruber et al., 2005] Bei den früheren Studien von George, Yip und Kuberski wurde bereits von einer starken Verkürzung des Ketenabbaus bei Anwesenheit von Wasser berichtet. Laimgruber et al. quantifizierten diesen Effekt. Sie bestimmten für den Abbau des Ketenintermediates in einer Mischung aus Ethanol/Wasser 1:1 eine Zeitkonstante von rund 13 ps. Die Bildung des in Abbildung 13 dargestellten Biradikals II konnte nicht nachgewiesen werden. Der letzte Schritt, die Umlagerung zur Nitrosobenzoesäure, vollzieht sich in ethanolischer Lösung nach Laimgruber et al. innerhalb von etwa 3 ns. [Laimgruber et al., 2005] Für die Anwendung in biologischen Systemen ist die Umlagerung in rein wässriger Lösung von Bedeutung. Für wässrige Lösungen studierten Donten et al. die Umlagerungsreaktion von 2-Nitrobenzaldehyd. [Donten et al., 2011] Hier wurde für die Ketenbildung eine leicht erhöhte Zeitkonstante von 700 fs ermittelt. Für den Abbau des Ketens ergibt sich jedoch, in Konsistenz mit den bereits vorgestellten Studien, eine deutlich geringere Zeitkonstante von 7 ps.



Die Dissoziation der entstehenden Nitrosobenzoessäure findet im Bereich von ca. 20 ns statt. Sie ist der limitierende Reaktionsschritt in der Protonierung der anwesenden Reaktanden. [Donten und Hamm, 2011] Damit liegt das Zeitintervall, das durch die Photolyse des 2-Nitrobenzaldehydes und die dadurch freigesetzten Protonen in pH-Sprungexperimenten zur Verfügung steht, theoretisch im Nanosekunden-Bereich. Erste Anwendungen, die das Potenzial der Anwendung in proteinogenen Systemen zeigen, wurden durch die Arbeitsgruppe um Viappiani berichtet. [Viappiani *et al.*, 1998a] Nach Anregung des 2-Nitrobenzaldehyd durch einen XeCl-Exciplex-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 308 nm, konnte dort die Kinetik des pH-Sprunges im Zeitintervall von 20 ns bis 5  $\mu$ s verfolgt werden. Weiterhin wurde die Protonierung des Polypeptids Poly-L-Lysin durch Umlagerung von HP-NPE-Phosphat in Abhängigkeit der Peptidkonzentration untersucht.

**Tabelle 3.** Durch 2-Nitrobenzaldehyd getriggerte pH-Sprung-Studien in proteinogenen Systemen

Ziel der Studie	realisierter pH-Sprung	Referenz
Helixbildung von Poly-L-glutaminsäure	pH 7,4 $\rightarrow$ <sup>a</sup>	[Abbruzzetti <i>et al.</i> , 2000b]
Protonierung in der Entfaltung von Apomyoglobin	pH 7,0–4,5 $\rightarrow$ <sup>a</sup>	[Abbruzzetti <i>et al.</i> , 2000a]
Dissoziationskinetik von Häm-Liganden in Cytochrom C	pH 7,0 $\rightarrow$ pH 4,0	[Abbruzzetti <i>et al.</i> , 2001]
Entfaltung von Apomyoglobin	pH 5,2 $\rightarrow$ pH 4,2	[Miksovska und Larsen, 2003]
Dissoziationskinetik der Histidin-Seitenkette in Cytochrom C	pH 7,0 $\rightarrow$ pH 4,0	[Abbruzzetti <i>et al.</i> , 2004]
Spektrale Änderungen des GFPmut2-Chromophors	pH 7,5 $\rightarrow$ pH 4,0	[Abbruzzetti <i>et al.</i> , 2005a]
Entfaltung der Helix von Poly-L-Glutamat	pH 8,6 $\rightarrow$ pH 6,7 pH 6,2 $\rightarrow$ pH 5,8	[Causgrove und Dyer, 2006]
Entfaltung von Myoglobin	pH 7,0 $\rightarrow$ pH 4,5	[Abbruzzetti <i>et al.</i> , 2006b]

<sup>a</sup> es wird kein pH-Wert angegeben, die Erzeugung von 1  $\mu$ M an Hydroniumionen wird angeführt

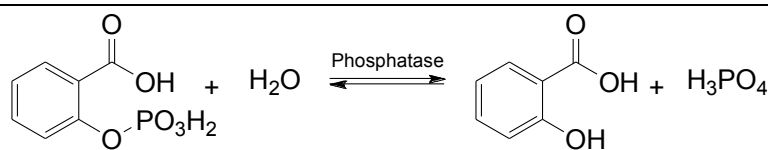
Eine Reihe von pH-Sprungstudien in proteinogenen Systemen wurden bereits veröffentlicht, die in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt sind. Die Vielzahl der Studien zeigt das Potenzial, das 2-Nitrobenzaldehyd für kinetische Untersuchungen in biologischen oder biochemischen Systemen besitzt. Darüber hinaus ist die Anwendung bislang aber hauptsächlich auf Studien zu Faltungsprozessen beschränkt. Das im Rahmen der vorgestellten Arbeit untersuchte pH-Sprungsystem soll diese Lücke schließen und die pH-Sprung-Methode auf die Aktivierung und somit Untersuchung der enzymatischen Funktion erweitern.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Absorptionsmessung zur Bestimmung der Enzymaktivität

##### 3.1.1. Ermittlung der enzymatischen Aktivität durch die Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat

Eine Testreaktion zur Bestimmung der Aktivität saurer Phosphatasen ist die Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat zu Salicylsäure (Abbildung 14). [Brandenberger und Hanson, 1953; Worthington Enzyme Manual Assay, 2013] Diese Reaktion wurde zur Charakterisierung des Enzyms und für Stabilitätsuntersuchungen gegenüber Laserstrahlung mit einer Wellenlänge von 265 nm und gegenüber dem Triggersubstrat 2-Nitrobenzaldehyd verwendet.



**Abbildung 14.** Enzymatische Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat zu Salicylsäure durch die saure Phosphatase

Zur Vorbereitung der Messung wurde das Enzym vor Beginn in Reinstwasser gelöst und bei Raumtemperatur für eineinhalb bis zwei Stunden inkubiert. Für den kontinuierlichen photometrischen Assay wurde die gelöste und vorverdünnte Phosphatase (Stammlösung 1 mg/mL) zu einer 0,73 mM Lösung von 2-Carboxyphenylphosphat gegeben, so dass eine Endkonzentration des Enzyms von 0,021 bis 0,084 mg/mL und 0,6 mM für das Substrat in der Probe resultiert. Nach Zugabe wurde umgehend die Reaktionsverfolgung gestartet und die einsetzende Bildung der Salicylsäure über eine Minute durch Verfolgung der Absorption bei 300 nm detektiert. Die Reaktion wurde, falls nicht anders beschrieben, bei 25 °C durchgeführt. Die Probenzusammensetzung ist zur Übersicht in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4.** Allgemeine Bedingungen zur Bestimmung der Aktivität über die Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat

	Probe	Referenz
150 mM Acetatpuffer pH 5,5	666 µL	666 µL
3,65 mM 2-Carboxyphenylphosphat	167 µL	167 µL
Vorverdünnte Enzymlösung	167 µL	-
Entionisiertes Wasser	-	167 µL

Die Aktivität kann aus dem linearen Teil der Produktbildung nach Gleichung 1 errechnet werden.

$$A = \frac{\Delta OD \cdot V_{K\ddot{u}v}}{\varepsilon_{Salicyls\ddot{a}ure, 300nm} \cdot d \cdot V_{Enzym} \cdot c_{Enzym, verd\ddot{u}nnt}} \quad (\text{Glg. 1})$$

Dabei entspricht  $A$  der spezifischen Aktivität und gibt den Reaktionsumsatz in  $\mu\text{mol}$  Substrat pro Minute und Milligramm Lyophilisat ( $\text{U/mg}$ ) wieder.  $\Delta OD$  ist der lineare Anstieg der Extinktion,  $V_{K\ddot{u}vette}$  das K\ddot{u}vettenvolumen,  $\varepsilon$  der Extinktionskoeffizient,  $d$  die Schichtdicke,  $V_{Enzym}$  das Volumen der zugesetzten Enzymlösung und  $c_{Enzym}$  die Konzentration an zugesetzter Enzymlösung. Falls die Daten nicht vorhanden waren (z. B. bei Lösungsmittelzusätzen oder variierenden pH-Werten), wurde der Extinktionskoeffizient der Salicylsäure bestimmt. Dazu wurde laut Lambert-Beerschem Gesetz die Extinktion verschiedener Substratkonzentrationen bei der gewünschten Wellenlänge bestimmt und der Extinktionskoeffizient aus dem linearen Anstieg der Funktion  $OD(c)$  bestimmt. Zur Bestimmung des pH-Profiles wurde, abweichend zu den allgemeinen Versuchsbedingungen, im pH-Bereich von 3,0 bis 5,5 ein 150 mM Acetatpuffer, von 6,0 bis 8,0 ein 150 mM TRIS-Maleatpuffer und für pH 8,5 und 9,0 ein 150 mM Boratpuffer verwendet. In den pH-Sprungexperimenten hingegen wurde als Reaktionsmedium statt eines Puffers eine 150 mM NaCl-Lösung verwendet.

### 3.1.2. Ermittlung der enzymatischen Aktivität durch die Hydrolyse von 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferon-phosphat

Eine weitere Reaktion zur Aktivitätsbestimmung ist die Hydrolyse von 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferonphosphat (CF-MUP) (Abbildung 15). [Yang *et al.*, 2008]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Reaktion für die laserinduzierte Aktivierung der Phosphatase verwendet. Des Weiteren wurde auch für dieses Substrat ein pH-abhängiges Aktivitätsprofil aufgenommen und die Stabilität gegenüber Laserstrahlung mit einer Wellenlänge von 355 und 388 nm sowie gegenüber dem Triggersubstrat ermittelt.

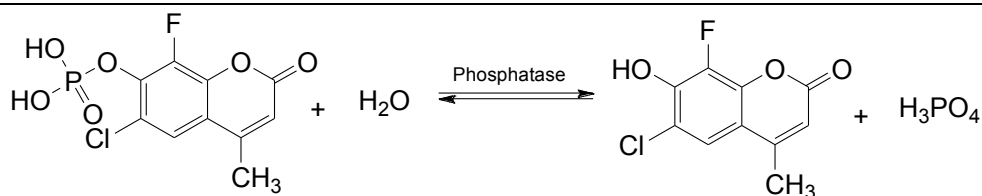


Abbildung 15. Enzymatische Hydrolyse von CF-MUP zu CF-MU durch die saure Phosphatase

Die Messung erfolgte in Analogie zum vorhergehend beschriebenen Assay durch Verfolgung der Produktbildung (CF-MU) anhand der Absorption bei 360 nm über 60 Sekunden. In Tabelle 5 wird die Zusammensetzung und Konzentration der Messlösungen zusammengefasst.

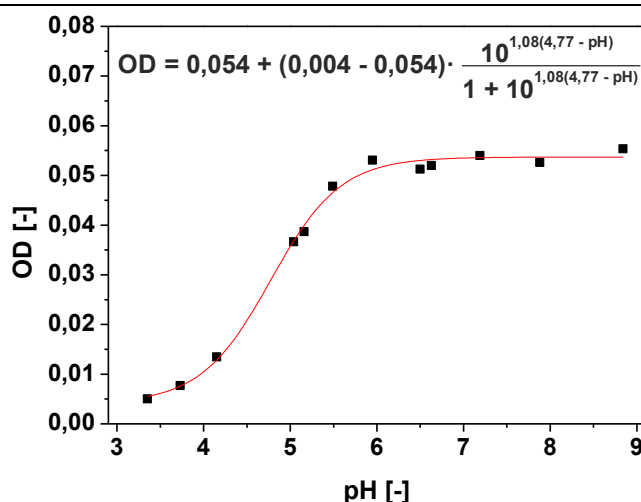
**Tabelle 5.** Allgemeine Bedingungen zur Bestimmung der Aktivität über die Hydrolyse von CF-MUP

	Probe	Referenz
1000 µM CF-MUP	833 µl	833 µl
Vorverdünnte Enzymlösung	167 µl	-
Entionisiertes Wasser	-	167 µl

Die Berechnung der Aktivität erfolgte anhand Gleichung 1. Der Extinktionskoeffizient des CF-MU wurde in bereits beschriebener Weise bestimmt. Art und Konzentration der verwendeten Puffer wurden bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Davon abweichende Bedingungen und Details zur Bestimmung des Einflusses der Laserstrahlung werden unter Abschnitt 3.4.1 und 3.4.3 ausgeführt.

### 3.1.3. Absorptionsmessung zur Bestimmung der Säurekonstante des 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferons

Die Bestimmung der Säurekonstante erfolgte über eine Säure-Base-Titration, welche spektroskopisch anhand der Absorption verfolgt wurde. Dazu wurden 5 µM CF-MU in 150 mM NaCl-Lösung gelöst. Durch Zugabe von NaOH und HCl wurden pH-Werte im Bereich von 3,5 bis 9 eingestellt und Absorptionsspektren der Lösungen aufgenommen. Die graphische Darstellung der Titrationskurve sowie die Funktion der mathematischen Auswertung ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16.** Graphische Auswertung der Titrationskurve zur Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes (5µM CF-MU in 150 mM NaCl; Einstellung der pH-Wert 3–9 mit NaOH oder HCl; Auswertung der optischen Dichte bei 360 nm)

Zur Auswertung wurde die optische Dichte bei 370 nm gegen den pH-Wert aufgetragen und nach Gleichung 2 ausgewertet [Abbruzzetti *et al.*, 2006b].

$$OD = a + (b - a) \cdot \frac{10^{n(pK_s - pH)}}{1 + 10^{n(pK_s - pH)}} \quad (\text{Glg. 2})$$

Dabei ist  $OD$  die optische Dichte des Absorptionsmaximums,  $a$  ist als Absorption der reinen deprotonierten Spezies und  $b$  als Absorption der reinen protonierten Spezies,  $pK_s$  als der negative dekadische Logarithmus der Säurekonstante und  $pH$  als der pH-Wert zu sehen.

### 3.1.4. Kinetische Untersuchungen

Für die Kalibrierung der Produktbildung wurde CF-MU im Bereich von 0,5 bis 10  $\mu\text{M}$  in 150 mM Acetatpuffer gelöst und die resultierende Absorption bei 360 nm gemessen. Im bereits beschriebenen kontinuierlichen Assay wurde die gelöste Phosphatase (0,25 mg/mL in Acetatpuffer pH 5,5) zu einer Lösung von 1,2 mM bis 10  $\mu\text{M}$  CF-MUP gegeben, wodurch eine finale Konzentration von 0,042 mg/mL für das Enzym und 1000 bis 8,33  $\mu\text{M}$  für das Substrat in der letztlichen Probe erreicht wurde. Die Reaktion wurde wie bereits beschrieben bei 360 nm unter Verfolgung der Absorption detektiert und aus dem Anstieg die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ermittelt. Aus Gleichung 3 kann die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{Max}$  und die Michaelis-Menten Konstante  $K_M$  errechnet werden (Gleichung 3).

$$v = V_{Max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Glg. 3})$$

Kinetische Daten wurden zusätzlich zum pH-Maximum auch bei einem pH-Wert 4,0 und 7,5 ermittelt um den Einfluss des pH-Wertes auf  $K_M$ -Wert und Maximalgeschwindigkeit zu beurteilen. Dazu wurde bei pH 4 ebenfalls ein 150 mM Acetatpuffer und bei pH 7,5 ein 150 mM TRIS-HCl-Puffer als Reaktionsmedium verwendet.

### **3.1.5. Bestimmung des Einflusses der photoaktivierbaren Substanzen auf die enzymatische Aktivität**

Um eine Deaktivierung der verwendeten photoaktivierbaren Substanzen auf das Enzym auszuschließen, wurde deren Einfluss auf die Hydrolyseaktivität untersucht. Hierbei wurde für die saure Phosphatase der Einfluss von verschiedenen konzentrierten Zusätzen und Verhältnissen an 2-Nitrobenzaldehyd/2-Nitrosobenzoessäure mit Hilfe des 2-Carboxyphenylphosphatassays untersucht. Dazu wurden im Assay (vgl. Abschnitt 3.1.1) statt des reinen Acetatpuffers Mischungen von 2-Nitrobenzaldehyd/2-Nitrosobenzoessäure verschiedener Konzentrationen in Acetatpuffer verwendet. Die Durchführung und Auswertung des Assays erfolgte ansonsten wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Darüber hinaus wurde das Ergebnis für 2-Nitrobenzaldehyd unter Verwendung des CF-MUP-Assays bestätigt und um weitere Untersuchungen zu den halogenierten Nitrobenzaldehyden erweitert. Dazu wurde in Analogie zu den beschriebenen Untersuchungen der Assay unter zusätzlicher Verwendung der photoaktivierbaren Substanzen mit einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  statt der reinen Substratlösung verwendet. [Höhne, 2012]

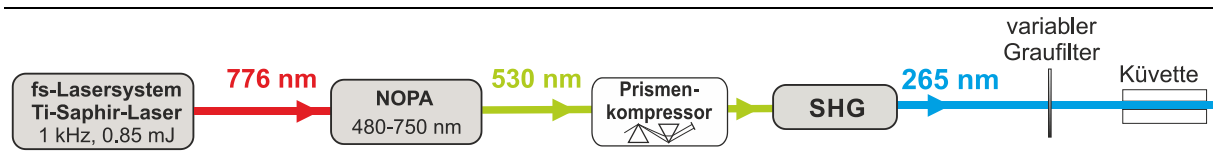
## **3.2. Charakterisierung der verwendeten photoaktivierbaren Verbindungen**

### **3.2.1. Charakterisierung des 2-Nitrobenzaldehydes**

Für die Untersuchungen der photolytischen Eigenschaften des 2-Nitrobenzaldehydes wurden zunächst Absorptionsspektren einer 100  $\mu\text{M}$  Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgenommen, um die Konstanz der Absorptionseigenschaften im verwendeten pH-Intervall sicherzustellen.

Im Weiteren wurde die Stabilität des 2-Nitrobenzaldehydes gegenüber dem Einfluss von Tageslicht über einige Stunden untersucht. Daraus schlussfolgernd wurde für alle Experimente die wässrige Lösung des 2-Nitrobenzaldehydes frisch und unter Ausschluss von Licht angesetzt.

Die Charakterisierung der photolytischen Umsetzung erfolgte durch Anregung der Reaktion bei einer Wellenlänge von 265 nm. Die Wellenlänge wurde anhand des Absorptionsspektrums des 2-Nitrobenzaldehydes ausgewählt. Die Ausgangsfrequenz von 780 nm wurde durch ein regeneratives Ti-Saphir-Verstärkersystem (CPA 2001, Clark MXR) erzeugt. Die verwendete Wellenlänge von rund 265 nm wurde durch Verwendung eines NOPA-Systems (Details des Aufbaus wurden bereits in [Wilhelm *et al.*, 1997] beschrieben) und anschließende Frequenzverdopplung realisiert (Abbildung 17). Der so erzeugte Anregungsstrahl besaß eine durchschnittliche Pulsleistung von 150 bis 350  $\mu\text{W}$ .



**Abbildung 17.** Experimenteller Aufbau für die Anregung der photolytischen Umlagerung des 2-Nitrobenzaldehydes zur Charakterisierung der Photolysereaktion

Für die Untersuchungen wurde eine wässrige 2-Nitrobenzaldehydlösung mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet, deren pH-Wert mittels konzentrierter Natronlauge auf 7,5 eingestellt wurde. Dies entspricht dem Ausgangs-pH-Wert des enzymatischen Systems. Die nachfolgende Beprobung erfolgte mittels UV/VIS-Absorptionsmessungen (Specord 50, Analytik Jena). Aufgrund des minimierten Probevolumens von 60  $\mu\text{L}$  wurde der Strahlengang des Photometers auf einen Durchmesser von 1,6 mm begrenzt werden. Dies wurde durch Implementierung einer entsprechenden Lochblende in den Strahlengang des Absorptionsspektrometers realisiert.

### 3.2.2. Charakterisierung der 4-Halogen-2-Nitrobenzaldehyde

#### Präparative Umsetzung der photoaktivierbaren Substanzen

Für die Charakterisierung der Photoprodukte wurden das 2-Nitrobenzaldehyd und seine halogenierten Derivate präparativ in einer Photolyse umgesetzt und isoliert. [Ciamician und Silber, 1901] Die Synthese erfolgte unter leichter Abwandlung nach einer bekannten Vorschrift. [Dommaschke, 2005] Dazu wurde eine 0,22 M Lösung der Aldehyde in Toluol in einem Photoreaktor bestrahlt. Da die Versuchsbedingungen für die Umsetzungen teilweise unterschiedlich waren, werden sie zur besseren Übersicht in Tabelle 6 dargestellt. Durch die Anregung im UV-Bereich wurde die entsprechende Nitrosobenzoessäure gebildet, die in aromatischen Lösungsmitteln ausfällt. Der Niederschlag wurde anschließend aus Ethanol umkristallisiert.

**Tabelle 6.** Versuchsbedingungen für die präparative Photolyse von 2-Nitrobenzaldehyd und seinen halogenierten Derivaten

Verbindung	Lichtquelle	$t_{\text{Bestrahlung}}$ [min]	Niederschlag	Ausbeute [%]
2-Nitrobenzaldehyd	Na-Halogen-Dampflampe	2·15 <sup>a</sup>	weiß-gelblich	25,6
4-Fluor-2-Nitrobenzaldehyd	Superlite 400 <sup>b</sup>	30	orange	40,9
4-Chlor-2-Nitrobenzaldehyd	Superlite 400 <sup>b</sup>	25	gelb	16,9
4-Brom-2-Nitrobenzaldehyd	Superlite 400 <sup>b</sup>	30	rotbraun	42,2

<sup>a</sup>Abtrennung des Niederschlages durch Filtration zwischen den Anregungszeiten

<sup>b</sup>Multi-spektrale Lichtquelle eingesetzter Wellenlängenbereich von 320–400 nm mit Filtern

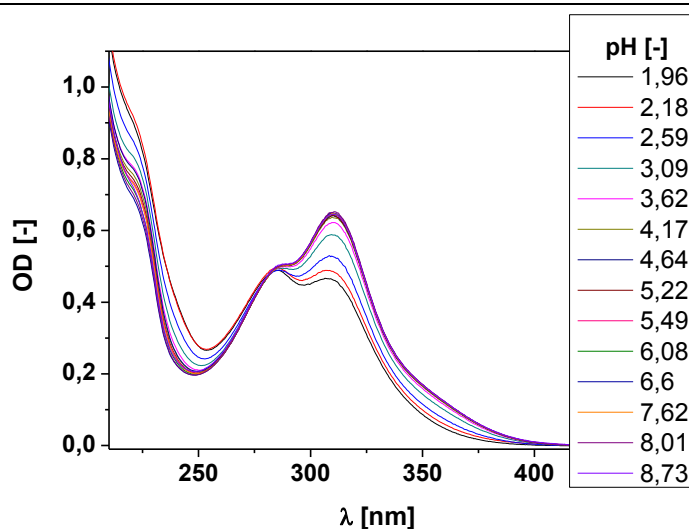
Die Umsetzungen wurden nicht hingehend ihres Umsatzes optimiert. Elementaranalysen und IR-Spektren weisen die Charakteristika der entsprechenden Zielprodukte auf. Eine Signalzuordnung innerhalb einer NMR-Analyse ist für 2-Nitrosobenzoessäure sehr umfassend, da sie in Lösung in einem komplexen konzentrations- und temperaturabhängigen Monomer-, *E*-Dimer- und *Z*-Dimergemisch vorliegt. Eine Zuordnung wurde in der Literatur von Schaper et al. beschrieben. [Schaper, 2008]

Die Verbindungen sowie die korrespondierenden Aldehyde wurden hinsichtlich ihrer Löslichkeit, ihrer Absorptionseigenschaften, ihrer photolytischen Umsetzung und ihrer Säurekonstanten untersucht.

## Bestimmung der Säurekonstante der 2-Nitrosobenzoessäure und ihrer Derivate

Die Bestimmung der Säurekonstante erfolgte über eine Säure-Base-Titration, welche spektroskopisch via UV-Vis-Absorption verfolgt wurde. 100  $\mu\text{M}$  der isolierten 2-Nitrosobenzoessäuren wurden in 150 mM NaCl-Lösung gelöst. Durch Zugabe von NaOH und HCl bzw.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurden pH-Werte im Bereich von 0,2 bis 6 eingestellt und Absorptionsspektren der Lösungen aufgenommen. Da die  $pK_s$ -Werte der Verbindungen im stark sauren Milieu liegen, kommt es bei der pH-Wert-Einstellung zu Verdünnungseffekten. Eine Auswertung der konzentrationsabhängigen optischen Dichte einer Wellenlänge, wie für CF-MU beschrieben (Glg. 2) führt daher zu fehlerbehafteten Werten.

Um dies zu vermeiden, wurde zur Auswertung das sich ändernde Verhältnis beider Absorptionsmaxima (Abbildung 18) herangezogen.



**Abbildung 18.** Photometrische Verfolgung der pH-Titration der 2-Nitrosobenzoessäure (100  $\mu\text{M}$  Nitrosobenzoessäure in 150 mM NaCl-Lösung; pH-Werteinstellung durch NaOH und HCl)



Die Titrationskurve der Nitrosobenzoesäuren wurde nach Gleichung 4 als leichte Abwandlung zu Gleichung 2 ausgewertet.

$$\frac{OD_{Max,1}}{OD_{Max,2}} = a + (b - a) \cdot \frac{10^{n(pK_s - pH)}}{1 + 10^{n(pK_s - pH)}} \quad (\text{Glg. 4})$$

Dabei ist  $OD_{Max,1}$  die optische Dichte des ersten Absorptionsmaximums,  $OD_{Max,2}$  die optische Dichte des zweiten Absorptionsmaximums,  $a$  ist als Absorption der reinen deprotonierten Spezies und  $b$  als Absorption der reinen protonierten Spezies,  $pK_s$  als der negative dekadische Logarithmus der Säurekonstante und pH als der pH-Wert zu sehen.

### 3.3. Laserinduzierte Anregung

#### 3.3.1. Allgemeine Probenvorbereitung

Die 2-Nitrobenzaldehydlösung wurde frisch angesetzt und unter Ausschluss von Licht aufbewahrt und für das weitere Vorgehen verwendet. Die Zugabe des verwendeten pH-Indikators Fluorescein erfolgte aus einer 3 mM ethanolischen Stammlösung.

Durch vorheriges Einleiten eines Argonstromes durch ca. 40 mL der Probelösung für mindestens zwei Stunden wurde gelöstes  $\text{CO}_2$  aus der Probe entfernt. Der Ausgangs-pH-Wert wurde währenddessen durch Zugabe von NaOH und HCl eingestellt und mit Hilfe eines pH-Meters überprüft.

**Tabelle 7.** Zusammenfassung der Probenzusammensetzung der verschiedenen laserinduzierten pH-Sprungexperimente

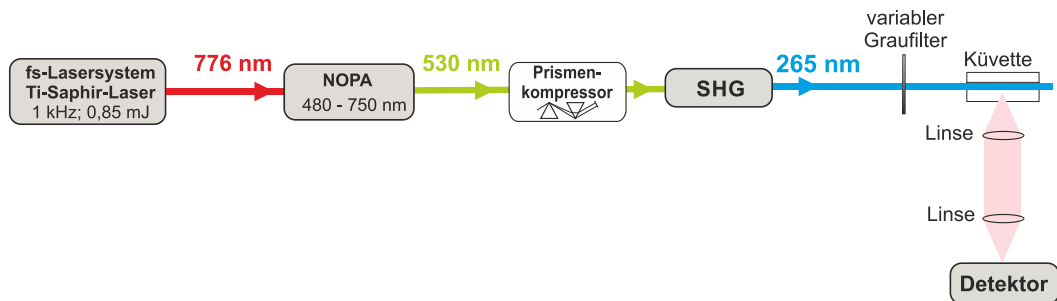
Messung	Zusammensetzung
pH-Sprungexperimente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100, 250 oder 500 <math>\mu\text{M}</math> 2-Nitrobenzaldehyd 3 <math>\mu\text{M}</math> Fluorescein</li> <li>• 500 <math>\mu\text{M}</math> 2-Nitrobenzaldehyd 83,3 <math>\mu\text{M}</math> CF-MUP 3 <math>\mu\text{M}</math> Fluorescein</li> <li>• 500 <math>\mu\text{M}</math> 2-Nitrobenzaldehyd 0,02–0,08 mg/mL Phosphatase 3 <math>\mu\text{M}</math> Fluorescein</li> </ul>
Enzymaktivierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 <math>\mu\text{M}</math> 2-Nitrobenzaldehyd 0,02–0,08 mg/mL Phosphatase 83,3 <math>\mu\text{M}</math> CF-MUP 3 <math>\mu\text{M}</math> Fluorescein</li> </ul>

Von der vorbereiteten Probe werden im Argonstrom 60 bzw. 45  $\mu\text{L}$  in eine Küvette überführt, welche dann verschlossen wurde. In Tabelle 7 wird die Zusammensetzung der verwendeten Probelösungen zusammengefasst. Bei Durchführung der Aktivierungsexperimente im Gesamtsystem wurden Substrat- und Enzymlösung separat entgast und erst unmittelbar vor der Anregung zusammengeführt.

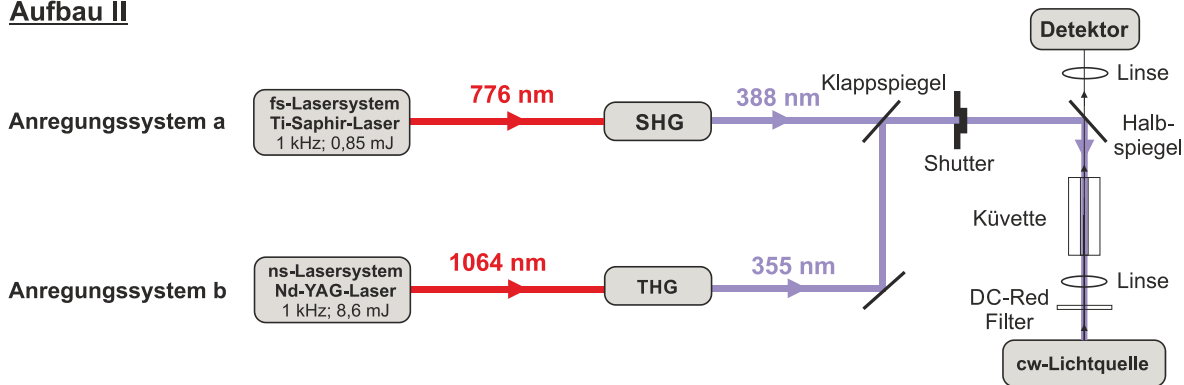
### 3.3.2. Aufbau und Durchführung der laserinduzierten Anregung

Die in der Arbeit vorgestellten Laserexperimente wurden an zwei verschiedenen Aufbauten durchgeführt, die zusammenfassend in Abbildung 19 dargestellt sind.

#### Aufbau I



#### Aufbau II



**Abbildung 19.** Experimentelle Aufbauten für die Erzeugung laserinduzierter pH-Sprünge

Aufbau I wurde für die Charakterisierung des 2-Nitrobenzaldehydes sowie für erste Anregungsexperimente der Phosphatase und Stabilitätsuntersuchungen der Enzymreaktion verwendet. Die Anregung erfolgte durch einen Titan-Saphir-Lasersystem (CPA 2001, Clark MXR). Die gewählte Wellenlänge von 265 nm wurde durch Verwendung eines NOPA-Systems (Details des Aufbaus wurden bereits in [Wilhelm *et al.*, 1997] beschrieben) und anschließende Frequenzverdopplung realisiert (Abbildung 19). Der so erzeugte Anregungsstrahl besaß eine Zentralwellenlänge von 265 nm und eine durchschnittliche Pulsleistung von 150 bis 350  $\mu\text{W}$ . Die Einstellung der exakten Laserleistung erfolgte über einen variablen Graufilter.

Der Anregungsstrahl besaß einen Durchmesser, der größer war als der Probenquerschnitt der Quarzküvette (2 mm Breite und 10 mm Schichtdicke), so dass eine vollständige Anregung des Probenvolumens von 60 µL gewährleistet war. In den Experimenten wurde die Probe typischerweise über 500 ms bis 1 s angeregt. Die Detektion dieser Messreihen erfolgte durch Fluoreszenzmessungen und wird in Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

Die weiteren Experimente wurden durch Verwendung des Aufbaus II durchgeführt (Abbildung 19, unten). Dieser experimentelle Aufbau wurde mit zwei unterschiedlichen Anregungssystemen verwendet, die an einen gemeinsamen Detektionsaufbau koppelbar sind (hier durch einen Klappspiegel symbolisiert). Zunächst wurde für die weiteren pH-Sprung-Untersuchungen eine Anregungswellenlänge von 388 nm verwendet (Aufbau II, Anregungssystem a). Diese stand unter den experimentellen Bedingungen mit einer relativ hohen Leistung zur Verfügung. Zur Erzeugung des pH-Sprungs wurde die verdoppelte Ausgangsfrequenz eines regenerativen 1 kHz Ti:Saphir-Verstärkersystem (CPA 2001, Clark MXR) eingesetzt. Es wurden Pulsleistungen von typischerweise ca. 160 mW mit einer Zentralwellenlänge von 388 nm verwendet. Der Anregungsstrahl besaß einen Durchmesser, der größer ist als der Probenquerschnitt der Quarzküvette (2 mm Breite und 10 mm Schichtdicke), so dass eine vollständige Anregung des Probenvolumens von 60 µL gewährleistet ist. Ein externer Shutter (SH05, Thorlabs) wurde für die Steuerung einer definierten Anregungszeit eingesetzt. In den Experimenten wurde die Probe typischerweise über 250 ms mit ungefähr 250 Pulsen angeregt. Die Detektion des pH-Sprungs erfolgte durch einen zweiten entgegen gerichteten Strahlengang einer kontinuierlichen UV-Vis-Lichtquelle (DH-2000-BAL, Ocean Optics). Der Detektionsstrahlengang wurde leicht in die Probe fokussiert und mit Hilfe eines Faserspektrometers (QE 65000, Ocean Optics) detektiert. In den pH-Sprungexperimenten wurde für die Detektion lediglich die Halogenlampe verwendet, um kurzwelliges Licht zu vermeiden. Dies war möglich, da die Detektion des pH-Sprungs bei 490 nm erfolgte.

Um einen Vergleich zum theoretisch realisierbaren pH-Wert anstellen zu können, wurde unter Berücksichtigung der experimentellen Bedingungen folgende Berechnung angestellt:

$$c_{Säure} = \frac{E_{Laser} \cdot N_{Pulse} \cdot OD \cdot \phi}{E_{Photon} \cdot V \cdot N_A} \quad (\text{Glg. 5})$$

$$c_{H_3O^+} = \left[ \frac{K_S}{2} + \sqrt{\left(\frac{K_S}{2}\right)^2 + K_S \cdot c_{Säure}} \right] \cdot \alpha \quad (\text{Glg. 6})$$

Dabei ist  $E_{Laser}$  der Energieeintrag der Laserstrahlung in J und ergibt sich aus dem Produkt der gemessenen Laserleistung und der Repetitionsrate.

$N_{Pulse}$  ist die Anzahl der zur Anregung verwendeten Pulse,  $OD$  die optische Dichte,  $\phi$  die Quantenausbeute der photochemischen Umsetzung.  $E_{Photon}$  ist die Energie eines einzelnen Photons in J und ergibt sich aus dem Produkt der verwendeten Frequenz und dem Planckschen Wirkungsquantum.  $V$  bezeichnet das bestrahlte Volumen in L und  $N_A$  ist die Avogadrokonstante in  $\text{mol}^{-1}$ . Aus der Konzentration der entstehenden Säure kann die Hydroniumionenkonzentration berechnet werden. Dies geschah unter der Annahme einer mittelstarken Säure und unter Berücksichtigung von  $\alpha$  dem Dissoziationsgrad der entstehenden Säure. Dieser ergibt sich aus der Säurekonstante und dem pH-Wert der Lösung.

In den Aktivierungsexperimenten wurde die einsetzende Enzymreaktion simultan zum pH-Sprung detektiert. Die Verfolgung der Enzymreaktion erfolgte im UV-Bereich. Um das kurzwellige UV-Licht herauszufiltern (200 bis 340 nm), das zu einem Umsatz an 2-Nitrobenzaldehyd führen würde, wurde ein Langpassfilter (DC-Red, Linos Photonics) in den Strahlengang gebracht.

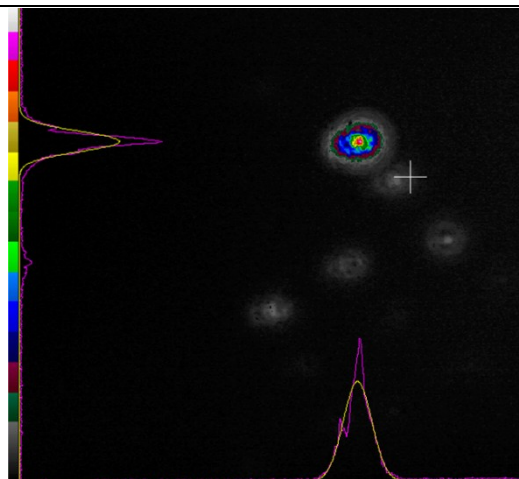
Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Anregung über ein diodengepumptes Lasersystem (NT 242, EKSPLA) basierend auf einem Nd-YAG-Laser (Aufbau II, Anregungssystem b). Für die Anregung des pH-Sprungs wurde die dritte Harmonische der Ausgangsfrequenz eingesetzt. Es wurden Pulsleistungen von typischerweise ca. 2,4 W mit einer Zentralwellenlänge von 355 nm verwendet. Einzel- oder Mehrfachimpulse wurden mit einer Repetitionsrate von 1 kHz zur Anregung verwendet. Ein extern gesteuerter Shutter (SH05, Thorlabs) wurde für die Realisierung einer definierten Anregungszeit eingesetzt. In den Experimenten wurde eine Probe von 45  $\mu\text{L}$  typischerweise mit einem bis sieben Pulsen angeregt. Die Detektion des pH-Sprungs erfolgte, wie bereits beschrieben über einen zweiten entgegen gerichteten Strahlengang einer kontinuierlichen UV-VIS-Lichtquelle (DH-2000-BAL, Ocean Optics). Der Detektionsstrahlengang wurde leicht in die Probe fokussiert und mit Hilfe eines Faserspektrometers (QE 65000, Ocean Optics) detektiert. Zusätzlich zu den bisher verwendeten photoaktivierbaren Substanzen, wurden auch die halogenierten Nitrobenzaldehyde auf ihre Eignung für die pH-Sprungexperimente hin untersucht. Hierbei wurden die Halogenderivate des 2-Nitrobenzaldehyd in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  verwendet, da nicht für alle Verbindungen eine ausreichende Löslichkeit in Wasser vorhanden war und auf diese Weise eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wurde.

Für eine erhöhte Absorption der Anregungsstrahlung wurde innerhalb der Enzymaktivierungsexperimente die Konzentration an 2-Nitrobenzaldehyd von 500 auf 750  $\mu\text{M}$  angehoben.

## Charakterisierung des Anregungsstrahlenganges

Um die Anregung ausreichend zu charakterisieren, wurde der Strahlengang in Aufbau II, Anregungssystem b hinsichtlich seines Durchmessers, seiner Pulsdauer und seiner Leistung untersucht.

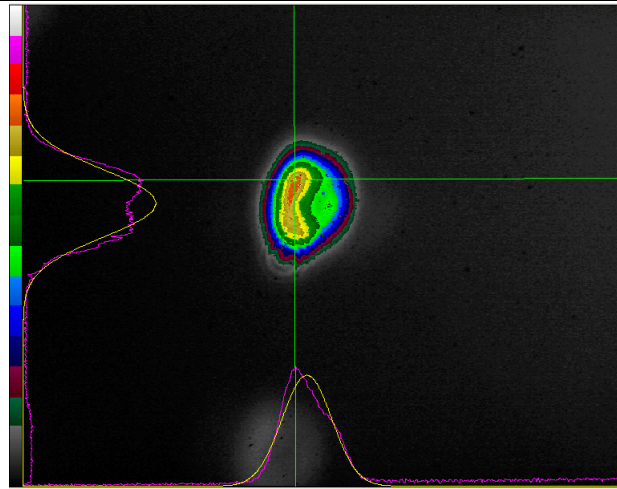
Zunächst erfolgte die Ermittlung des Strahldurchmessers mittels Beamkamera (Lasercam, HR, Coherent). Er wurde mit 100 % output und 180  $\mu$ s Q-Switch vermessen und wurde durch Graufilter abgeschwächt (durch insgesamt fünf Filter: zwei Filter OD = 2,0; zwei Filter OD = 1,0 und ein Filter OD = 0,6). Durch die Analysensoftware (Beamview USB-Analyzer) des Herstellers wird der Durchmesser des Strahlengangs bereits ohne weitere Auswertung ausgegeben. In Abbildung 20 ist das Strahlprofil des Anregungsstrahls abgebildet. Die Darstellung zeigt dabei den Querschnitt des Strahls, sowie die Normalverteilungen der Intensität in der x- und y-Ebene. Hier besitzt der Strahlengang nahezu gaußförmige Intensitätsprofile und es zeigt sich ein leicht elliptisches Strahlprofil.



**Abbildung 20.** Geometrisches Strahlprofil des Nd-YAG-Lasers (bei 100 % output und 180  $\mu$ s Q-Switch nach Abschwächung)

Es ist zu sehen, dass der Strahlengang in x-Richtung gegenüber der y-Ebene verbreitert ist. Darüber hinaus sind auch ein weitere Intensitäten zu erkennen, die von den, zur Abschwächung während der Beamcharakterisierung verwendeten, Filtern herrühren. Diese spielen für die Auswertung hier und für die pH-Sprungexperimente jedoch keine Rolle. Für die Anwendung der maximalen Leistung, die auch in den pH-Sprungexperimenten eingesetzt wurde, besitzt der Strahlengang einen mittleren Durchmesser von 0,82 mm in x- und 0,57 mm in y-Richtung. Die bestrahlte Probelösung besitzt bei einem Volumen von 45  $\mu$ L Dimensionen von 2 x 2,25 x 10mm (x,y,z-Ebene).

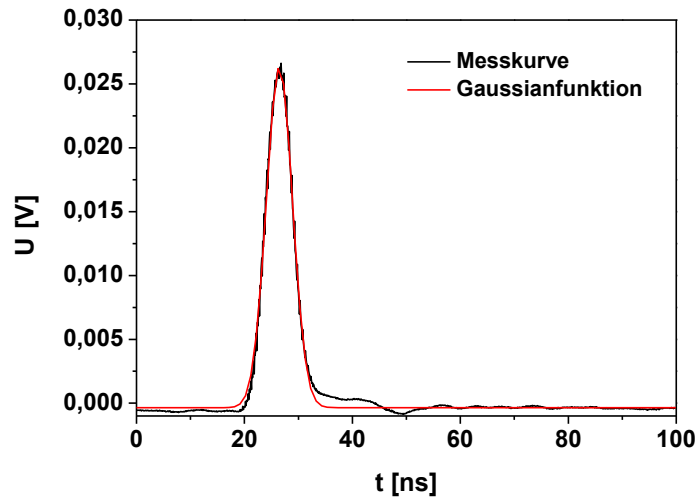
Aufgrund der geringfügigen Ausleuchtung der Probelösung und der damit verbundenen Instabilität des erzeugten pH-Wertes wurden apparative Details des Aufbaus optimiert um zu einer weiteren Verbesserung zu gelangen. Dies führte zu einer Veränderung des geometrischen Strahlprofils im Anregungsstrahlengang.



**Abbildung 21.** Geometrisches Strahlprofil des Nd-YAG-Lasers nach Optimierung des experimentellen Aufbaus (bei 100 % output und 180  $\mu$ s Q-Switch nach Abschwächung)

Es handelt sich, wie bereits im vorhergehenden Aufbau, nicht um ein rotationssymmetrisches Strahlprofil. Dabei zeigt das Profil eine leichte Verbreiterung in y-Richtung. Auch die Normalverteilung der Intensitätsprofile zeigt Abweichungen zur Gaußverteilung. So ist das Intensitätsmaximum in der x-Ebene leicht verschoben, während sich in y-Richtung zwei Maxima zeigen. Es wurde ein mittlerer Durchmesser von 1,4 mm in x- und 1,9 mm in y-Richtung ermittelt. Bei einem bestrahlten Volumen von  $2 \times 2,25 \times 10$  mm (x,y,z-Ebene) bedeutet das, dass die Lösung zu 70 % in x- und zu 84 % in y-Richtung ausgeleuchtet ist. Dies ist, wenn auch keine vollständige Ausleuchtung, eine deutliche Verbesserung zur vorherigen Ausleuchtung von 41 % in x- und 4 % in y-Richtung.

Neben dem geometrischen Profil wurde auch das zeitliche Peakprofil aufgenommen. Die Messung der Pulsdauer erfolgte mit Hilfe einer Photodiode und wurde durch ein Oszilloskop (DSO6104A, Agilent Technologies) ausgelesen. Hierbei waren die Messbedingungen analog zu denen der Bestimmung des Durchmessers. Die gemessenen Peakprofile wurden in Origin mit Hilfe der Gaussian-Funktion, dargestellt (Abbildung 22 und Wiederholungsmessung in Abbildung 70) und aus den Parametern die Peakbreite (als Halbwertsbreite, Full width at half maximum, FWHM) bestimmt. Hierbei konnte eine Pulslänge von 6 ns bestimmt werden.



**Abbildung 22.** Zeitliches Pulsprofil des Anregungsstrahls (Messung bei 100 % output und 180  $\mu$ s Q-Switch; abgeschwächt durch ND-Filter)

Um die Laserleistung zu ermitteln, die tatsächlich in die photochemische Reaktion eingebracht wird, wurden Actinometer-Messungen unter Verwendung von 2-Nitrobenzaldehyd durchgeführt. Das 2-Nitrobenzaldehyd ist in der Literatur bereits als Actinometersubstanz für die Quantifizierung der Leistung des Sonnenlichtes bekannt. [Galbavy *et al.*, 2010] Auch für die vorliegenden Messungen sollte es für die Quantifizierung der Leistung genutzt werden. Ist die Quantenausbeute einer Reaktion bekannt, so kann über den erreichten Umsatz der Photolyse auf die dafür aufgebrauchte Leistung geschlossen werden. Die Berechnung erfolgt nach den Gleichungen 7 bis 11 [Galbavy *et al.*, 2010].

$$P_{Laser} = I_{\lambda} \cdot N_A \cdot E_{Photon} \cdot V_{Kuvette} \quad (\text{Glg. 7})$$

$$I_{\lambda} = \frac{j_{2-NBA}}{2,303 \cdot \varepsilon_{2-NBA,\lambda} \cdot \phi_{2-NBA,\lambda} \cdot d} \quad (\text{Glg. 8})$$

$$j_{2-NBA} \cdot t = -\ln \left( \frac{c_{2-NBA,t}}{c_{2-NBA,0}} \right) \quad (\text{Glg. 9})$$

$$c_{2-NBA,0} = \frac{OD_{0,\lambda}}{\varepsilon_{2-NBA,\lambda}} \quad (\text{Glg. 10})$$

$$c_{2-NBA,t} = \frac{OD_{t,\lambda} - \varepsilon_{2-NBS,\lambda} \cdot c_{2-NBA,0}}{\varepsilon_{2-NBA,\lambda} - \varepsilon_{2-NBS,\lambda}} \quad (\text{Glg. 11})$$

Dabei ist  $P$  die Laserleistung, die sich aus dem Photonenfluss  $I$ , der Avogadrokonstante  $N_A$ , der Energie  $E$  der Photonen und dem Küvettenvolumen  $V$  ergibt. Weitere benötigte Größen sind die Geschwindigkeitskonstante der Photolyse  $j$ , der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$ , die Quantenausbeute  $\phi$ , die Konzentration  $c$ , die optische Dichte  $OD$ , die Schichtdicke  $d$  und die Zeit  $t$ . Um die eingesetzte Leistung mit der verwendeten zu vergleichen, wurden beide ins Verhältnis gesetzt. Dabei ist von einer theoretischen Leistung von 421 MW pro Puls auszugehen.

### 3.4. Detektion in den Aktivierungsexperimenten

#### 3.4.1. Fluoreszenzmessung zur Verfolgung der Enzymaktivität

Für die Anregung innerhalb des Aufbau I wurde die Stabilität des Enzyms unter Reaktionsbedingungen getestet. Die Proben entsprachen der in Tabelle 4 beschriebenen Zusammensetzung. Die Quantifizierung der enzymatischen Reaktion erfolgte über die Fluoreszenz der entstehenden Salicylsäure ( $\lambda_{exc} = 265 \text{ nm}$ ) bei einer Emissionswellenlänge von 415 nm (vgl. Abbildung 36). Für die Kalibrierung der Produktbildung wurden Salicylsäure und 2-Carboxyphenylphosphat in 150 mM Acetatpuffer pH 5,5 im Bereich von 0,02 bis 0,3 mM für Salicylsäure und 0,3 bis 0,6 mM für 2-Carboxyphenylphosphat gelöst. Die resultierende Fluoreszenz bei 415 nm wurde aufgezeichnet. Da es durch die Anregung der Fluoreszenz mit dem gepulsten Lasersystem zu einer leichten Zersetzung der Salicylsäure kam, wurde diese über Referenzmessungen untersucht und die enzymatische Reaktion um diesen Betrag korrigiert.

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute der Salicylsäure erfolgte relativ zu einem Standard mit bekannter Quantenausbeute. Hierfür wurde Chininsulfat Dihydrat (in 0,05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) als Referenzsubstanz verwendet, welches eine Quantenausbeute von 0,52 besitzt. [Meech und Phillips, 1983] Sowohl von der Probe, als auch vom Standard wurden wässrige Lösungen angesetzt, deren Absorption bei der gewählten Anregungswellenlänge von  $265 \text{ nm} \leq 0,1$  beträgt. Nach Aufnahme des Fluoreszenzspektrums durch Anregung bei 265 nm erfolgte dann die Berechnung der Fluoreszenzquantenausbeute durch folgenden Zusammenhang [Meech und Phillips, 1983] :

$$\phi_x = \phi_{Ref} \cdot \frac{\int F_x(\lambda) d\lambda}{\int F_{Ref}(\lambda) d\lambda} \cdot \frac{OD_{Ref}(\lambda_{exc})}{OD_x(\lambda_{exc})} \quad (\text{Glg. 12})$$

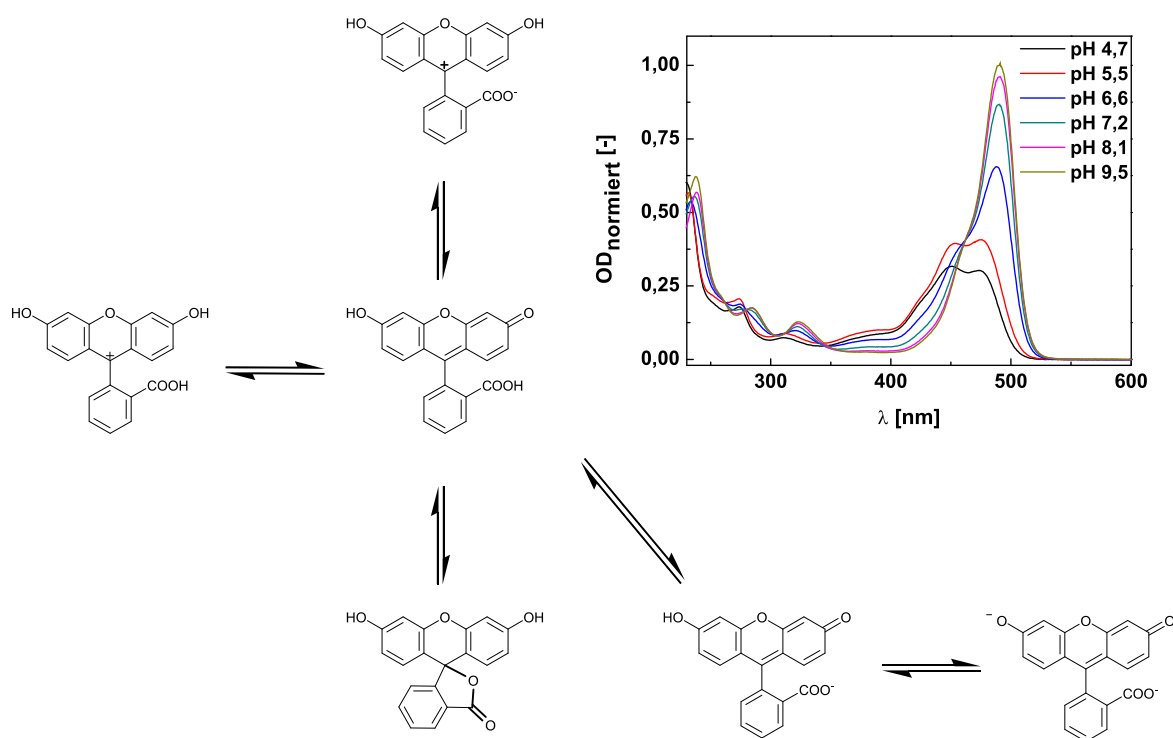
Dabei ist  $\int F(\lambda) d\lambda$  die Fläche unter Kurve des Emissionsspektrums, OD die optische Dichte bei der Anregungswellenlänge und  $\phi_{Ref}$  die Quantenausbeute des Standards. Für die Stabilitätsuntersuchungen des Enzyms erfolgten jeweils zwei Messungen, die vergleichend den Einfluss der Laserstrahlung zeigen sollten. Die Referenzmessung ohne Bestrahlung wurde durch UV-Absorptionsverfolgung bei 300 nm durchgeführt, während die Bestrahlungsmessung im Laseraufbau unter Beobachtung der Fluoreszenz der Salicylsäure stattfand.



### 3.4.2. Detektion des pH-Sprunges

Für die Quantifizierung des pH-Sprunges diene Fluorescein als pH-Indikator. Gängige pH-Indikatoren weisen oft einen sehr scharfen Umschlagbereich auf.

Das hat den Nachteil, dass die pH-Werte vor und nach dem Umschlagpunkt nur mit unzureichender Genauigkeit gemessen werden können. Da sich der zu erreichende pH-Sprung über mehrere pH-Einheiten erstreckt, würde dadurch sowohl die Bestimmung des Ausgangs-pH als auch die Endpunktbestimmung negativ beeinflusst.



**Abbildung 23.** pH-abhängiges Absorptionsverhalten des Fluoresceins (30  $\mu\text{M}$  Fluorescein in wässriger Lösung mit 0,1 % Ethanol; pH-Werteinstellung erfolgte durch NaOH und HCl)(prototrophe Formen [Klonis und Sawyer, 1996] entnommen)

Die prototropen Formen des Fluoresceins (Abbildung 23) sind bekannt und ihr Einfluss auf das pH-abhängige Verhalten charakterisiert. [Klonis und Sawyer, 1996] Fluorescein bietet gegenüber anderen pH-Indikatoren den Vorteil, dass sich die Änderung des Absorptionsverhaltens über einen sehr weiten pH-Bereich erstreckt. Dies ist in Abbildung 63 im Anhang vergleichend für das pH-abhängige Absorptionsverhalten von Fluorescein und Bromkresolgrün dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass der Umschlagbereich des Fluorescein gegenüber dem des Bromkresolgrün deutlich aufgeweitet ist. So schlägt das Bromkresolgrün innerhalb von anderthalb pH-Einheiten zwischen pH 3 und 5,5 um, während das Fluorescein über einen großen Bereich zwischen pH 4 und pH 9 Änderungen in der Absorption zeigt.

Das bedeutet, dass eine exaktere Bestimmung des pH-Wertes über die Absorption sowohl im leicht sauren als auch im basischen Bereich möglich war. Die Auswertung der Datensätze erfolgte am Absorptionsmaximum des Fluorescein von 490 nm. Dazu wurden die Datensätze, nach Basislinienkorrektur, auf die zuvor erstellte Kalibrierung des Fluoresceins (siehe Abbildung 64 im Anhang) angewendet.

### **3.4.3. Detektion der Enzymaktivierung**

Der Start der enzymatischen Reaktion wurde durch Absorptionsverfolgung bei 370 nm (leicht rotverschoben zum Absorptionsmaximum) ermittelt, um Störungen durch aus der Photoreaktion resultierenden Absorptionsänderungen zu vermeiden.

Für die Kalibrierung der Produktbildung bei der Auswertungswellenlänge von 370 nm wurden CF-MU und CF-MUP in Acetatpuffer pH 5,5 im Bereich von 0 bis 10  $\mu\text{M}$  für CF-MU und 83,3 bis 73,3  $\mu\text{M}$  für CF-MUP gelöst. Die resultierende Absorption bei 370 nm wurde aufgezeichnet. Die Probenzusammensetzung ist je nach Experiment variabel und wurde bereits in Tabelle 7 zusammengestellt.

Die Datensätze wurden nach Basislinienkorrektur durch Referenzproben von 2-Nitrobenzaldehyd (oder einem der anderen verwendeten Phototrigger), vor und nach der Anregung, korrigiert. Anschließend wurden die Daten auch auf die erstellte Kalibrierung angewendet. Um dies zu veranschaulichen ist in Abbildung 67 und Abbildung 68 im Anhang das Vorgehen der Auswertung beschrieben und illustriert.

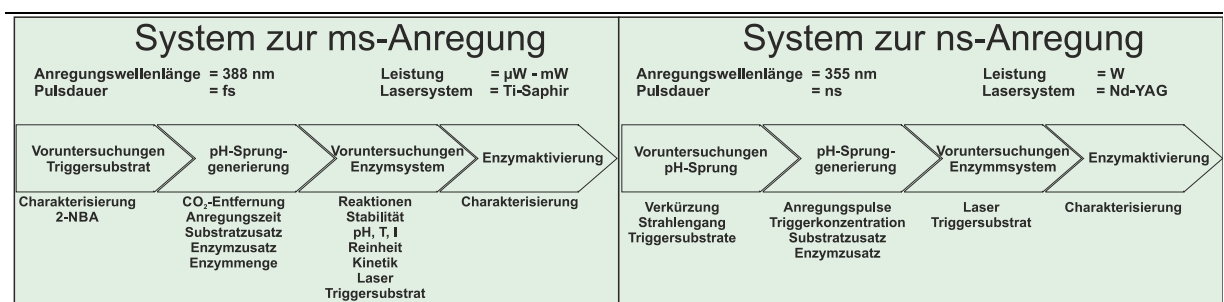
Auch für Aufbau II wurden Stabilitätsmessungen durchgeführt, die den Einfluss der Laserstrahlung auf die Enzymaktivität zeigen sollen. Diese Untersuchungen wurden für das Anregungssystem a und b ausgeführt. Die Probe wurde der Strahlung nicht kontinuierlich über den gesamten Verfolgungszeitraum ausgesetzt, sondern wie in den Sprungexperimenten vorgesehen über einen kurzen Zeitraum bei hohen Leistungen. Dazu wurde die Hydrolyse von CF-MUP unter folgenden Bedingungen verglichen:

- i) ohne Bestrahlung
  - die Probenzusammensetzung entspricht Tabelle 5
  - die Reaktionsverfolgung erfolgte ohne Anregung
- ii) mit Bestrahlung
  - die Probenzusammensetzung entspricht Tabelle 5
  - die Reaktionsverfolgung erfolgte insgesamt für 60 Sekunden
  - für 30 Sekunden vor der Anregung und für weitere 30 Sekunden nach der Anregung
  - die Anregung erfolgte für 250 ms mit 250 Pulsen (Anregungssystem a) oder für sieben ms mit sieben Anregungspulsen (Anregungssystem b)

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Die Weiterentwicklung experimenteller Methoden, wie z. B. der zeitaufgelösten Spektroskopie, erlaubt die Beobachtung enzymatischer Reaktionen und ihrer Teilprozesse in biologisch relevanten Zeitskalen. So könnte es in Zukunft ermöglicht werden der detaillierten Aufklärung der Enzymkatalyse ein ganzes Stück näher zu kommen. Die wesentliche Herausforderung derartiger Untersuchungen ist es mit Hilfe der experimentellen Methoden das große Zeitintervall zugänglich zu machen, das dynamische Prozesse in der Enzymkatalyse einnehmen können (vgl. Abbildung 5). [Callender und Dyer, 2006; Kao *et al.*, 2007] Der Einsatz von gepulsten Lasern als Triggersignal bietet das große Potenzial der Einführung veränderter Umgebungsparameter in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur lichtinduzierten Steuerung enzymatischer Aktivität. Diese Methode sollte, im Gegensatz zu den bereits bestehenden Aktivierungsmethoden (vgl. Kapitel 1), nicht auf eine bestimmte Klasse von Enzymen beschränkt sein. Darüber hinaus sollte sie dabei über den Vorteil einer hohen zeitlichen Auflösung für die spätere Anwendung in Echtzeitanalysen verfügen. Die Anwendung einer pH-Sprungmethode erfüllt dabei potentiell beide Kriterien. Zum einen benötigen aktivierbare Enzyme lediglich ein signifikantes pH-abhängiges Aktivitätsprofil. Zum anderen ist durch die Anwendung von ultrakurzen Laserpulsen als anwendbares Triggersignal auch eine potenziell hohe zeitliche und örtliche Auflösung gewährleistet. Dabei wurden die Untersuchungen für die pH-Sprunggenerierung auf den Einsatz von 2-Nitrobenzaldehyd und seinen Derivaten als photoaktivierbare Substrate beschränkt.



**Abbildung 24.** Übersichtsgraphik der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen

Das untersuchte System ist durch seine Vielzahl an Komponenten und Variablen sehr komplex. Daher wird die Übersichtsgraphik (Abbildung 24) innerhalb dieses Kapitels wiederkehrend eingesetzt, um den Überblick über die Gesamtheit der Arbeit zu gewährleisten und zu erleichtern.

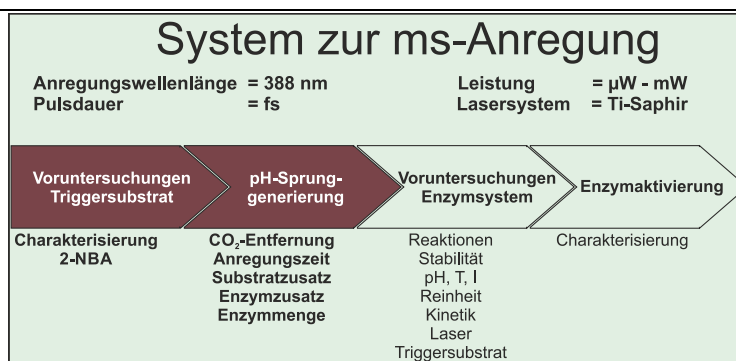
Im Verlauf der Arbeit erfolgten die Untersuchungen an zwei unterschiedlichen Lasersystemen.

Im ersten Abschnitt der Arbeit stehen Untersuchungen an einem Femtosekunden-Lasersystem basierend auf einem Ti-Saphir-Laser im Vordergrund. In diesem Teil der Arbeit wird bewiesen, dass das Konzept der pH-Sprungmethode zur Aktivierung der enzymatischen Aktivität eingesetzt werden kann. Dazu wird zunächst separat die Optimierung des pH-Sprungsystems und der enzymatische Reaktion vorgestellt. Im Anschluss wird die Kopplung beider Systeme zur Enzymaktivierung im Millisekunden-Bereich beschrieben.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Optimierung des erarbeiteten Methodenkonzeptes in Bezug auf die zeitliche Auflösung der Anregung vorgestellt. Hierzu wurde ein neu zur Verfügung stehendes Nanosekunden-Lasersystem basierend auf einem Nd-YAG-Laser verwendet. Erneut wird die Charakterisierung des pH-Sprungsystems dargestellt sowie die Kompatibilität der veränderten Messbedingungen für das enzymatische System geprüft. Abschließend wird die Enzymaktivierung durch Anregung im Nanosekunden-Bereich beschrieben.

#### 4.1. Demonstration der pH-Sprunggenerierung im Milli-sekunden-Bereich

Für das pH-Sprungsystem wurde 2-Nitrobenzaldehyd als Triggersubstrat gewählt. Die Photochemie dieser Verbindung war bereits bekannt (vergleichend Abschnitt 2.2.2) und ihre Anwendung in biologischen Systemen getestet. Der realisierbare Zeitbereich des pH-Sprunges durch 2-Nitrobenzaldehyd ist theoretisch auf etwa 20 ns limitiert. [Donten *et al.*, 2011] Das bedeutet, bei voller Ausschöpfung des Potenzials der laserinduzierten Sprungexperimente kann das große Zeitintervall von Nanosekunden bis Sekunden für die Echtzeitanalyse der Biotransformationen zugänglich gemacht werden.



Auf der Basis erster Voruntersuchungen erfolgte der Aufbau des pH-Sprungsystems und dessen Optimierung. In diesem ersten Schritt lag der Schwerpunkt der Optimierung darauf, die Umsetzbarkeit

der entwickelten Methode zu demonstrieren. Daher stand zunächst die Erzeugung eines ausreichend großen und stabilen pH-Sprunges im Mittelpunkt, ohne die zeitliche Auflösung des Systems zu optimieren.

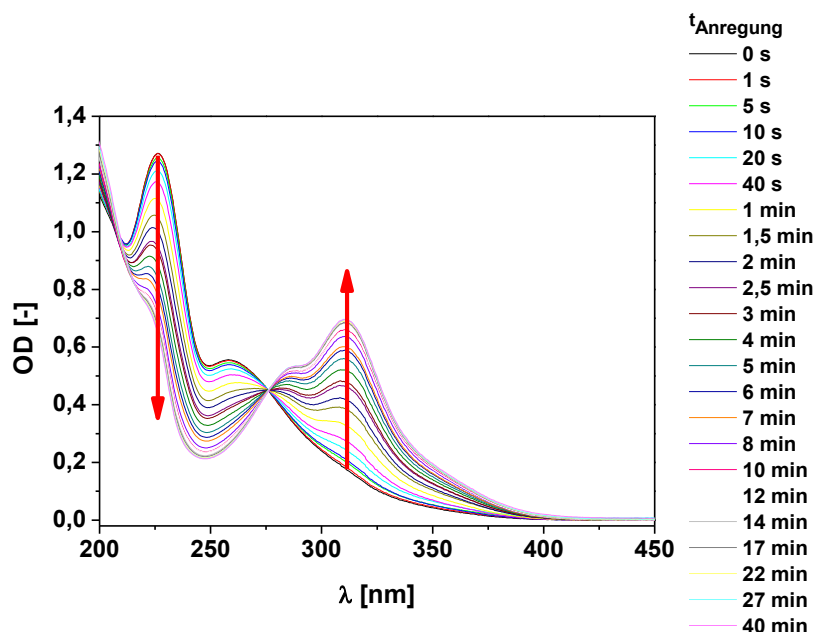
#### **4.1.1. Charakterisierung der Photolyse von 2-Nitrobenzaldehyd**

In diesem Abschnitt erfolgt die photochemische Charakterisierung des 2-Nitrobenzaldehydes. In der Literatur sind bereits pH-Sprung-Experimente zum 2-Nitrobenzaldehyd durch Einphotonenanregung bei 355 nm [Abbruzzetti *et al.*, 2003], sowie bei 266 nm [Causgrove und Dyer, 2006] oder durch Mehrphotonenanregung bei 720 und 740 nm [Diaspro *et al.*, 2003; Nag *et al.*, 2009] bekannt. In diesen Fällen fand die Anregung durch ein Nd-YAG-Lasersystem statt.

Zum Zeitpunkt der Experimente stand für die vorgestellten Untersuchungen ein Ti-Saphir-Lasersystem zur Verfügung. Dieses konnte zum einen bei einer Wellenlänge von 388 nm (durch Frequenzverdoppelung der fundamentalen Wellenlänge von 776 nm) mit relativ hoher Leistung oder unter Leistungsverlusten unter Verwendung eines NOPA-Systems [Riedle *et al.*, 2000] auf einer beliebigen Wellenlänge genutzt werden. Die Charakterisierung des 2-Nitrobenzaldehydes erfolgte für zwei verschiedene Wellenlängen. Zum einen für die Wellenlänge von 388 nm, da diese mit relativ hoher Leistung zur Verfügung gestellt werden konnte und zum anderen für 265 nm, da für diese Wellenlänge bereits die pH-Sprunggenerierung in biologischen Systemen [Causgrove und Dyer, 2006] berichtet wurde. Die erhaltenen Ergebnisse wurden hinsichtlich der Anwendbarkeit für die pH-Sprungversuche verglichen um die geeignete Wellenlänge zu ermitteln.

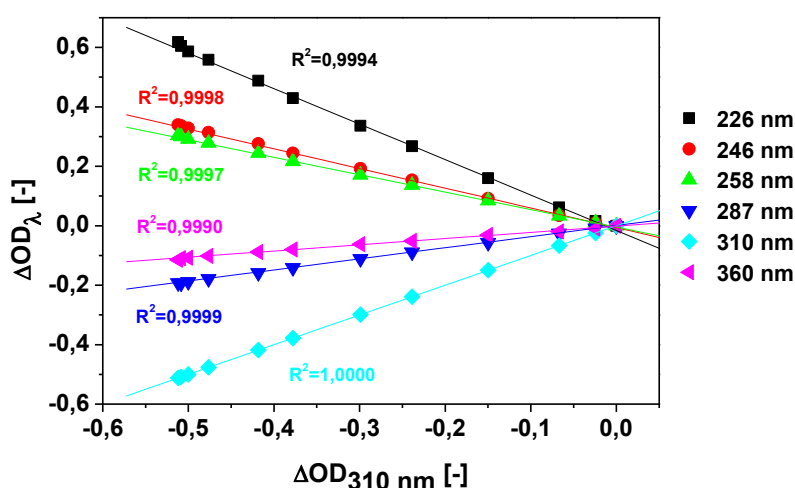
Für die Charakterisierung der Photolyse wurde die Anregung einer 100  $\mu$ M wässrigen 2-Nitrobenzaldehydlösung untersucht. Die ausgewählte Anregungswellenlänge von 265 nm zeigt (Absorptionsspektrum, Abbildung 66 im Anhang) eine ausreichend hohe Absorption. Die Anregung erfolgte mit einer mittleren Laserleistung von 220  $\mu$ W. Die Aufnahme der Absorptionsspektren wurde jeweils im Anschluss an die Bestrahlung durchgeführt.

Die zeitliche Verfolgung der photochemischen Umsetzung ist in Abbildung 25 dargestellt. In dieser Abbildung werden die Absorptionsspektren der 2-Nitrobenzaldehydlösung nach verschiedenen Anregungszeitpunkten gezeigt. Es ist ersichtlich, dass mit zunehmender Anregungszeit die Intensität des Absorptionsmaximums des 2-Nitrobenzaldehydes von 226 nm sinkt. Gleichzeitig kommt es zur Ausbildung eines neuen Absorptionsmaximums von 310 nm. Letzteres kann der Absorption durch die 2-Nitrosobenzoessäure zugeordnet werden. [Abbruzzetti *et al.*, 2003]



**Abbildung 25.** Zeitliche Verfolgung der photochemischen Umsetzung des 2-Nitrobenzaldehydes ( $\lambda_{exc} = 270 \text{ nm}$ ;  $P_{Laser} = 220 \text{ } \mu\text{W}$ ;  $t_{exc} = 0\text{--}2420 \text{ s}$ ; Verfolgung über die Aufnahme von Absorptionsspektren von 200–450 nm)

Darüber hinaus wird bei der Umsetzung das Auftreten eines isosbestischen Punktes bei etwa 276 nm beobachtet (Abbildung 25). Das deutet darauf hin, dass die Reaktion einheitlich verläuft. [Becker, 1991] Das heißt, aus dem Substrat ist entweder nur ein Produkt detektierbar oder mehrere Produkte stehen in einem festen Verhältnis zueinander.

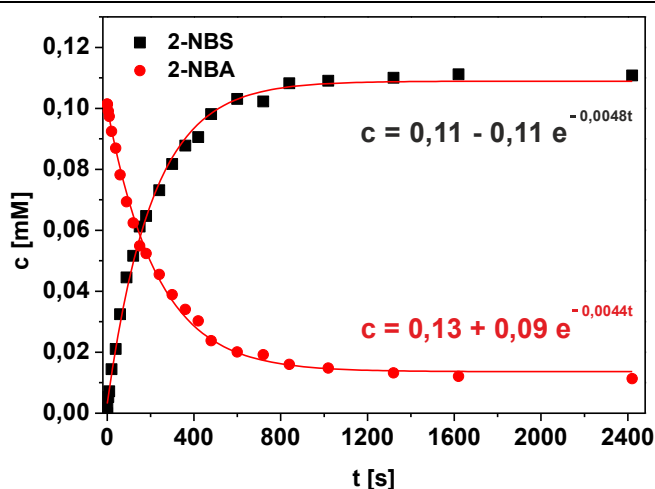


**Abbildung 26.** Extinktionsdifferenzendiagramm der photolytischen Umsetzung von 2-Nitrobenzaldehyd

Da durch isosbestische Punkte die Anreicherung von Zwischen- oder Nebenprodukten nicht eindeutig widerlegt wird, erfolgt eine weitere Betrachtung der Umsetzung durch ein Extinktionsdifferenzendiagramm (Abbildung 26).

Erhält man bei Auftragung der Extinktionsänderung (Änderung der optischen Dichte) einer beliebigen Wellenlänge gegenüber der Extinktionsänderung einer Referenzwellenlänge einen linearen Zusammenhang, so ist nur eine linear unabhängige Reaktion im untersuchten Zeitregime detektierbar. [Becker, 1991; Perkampus und Kaufmann, 1991]

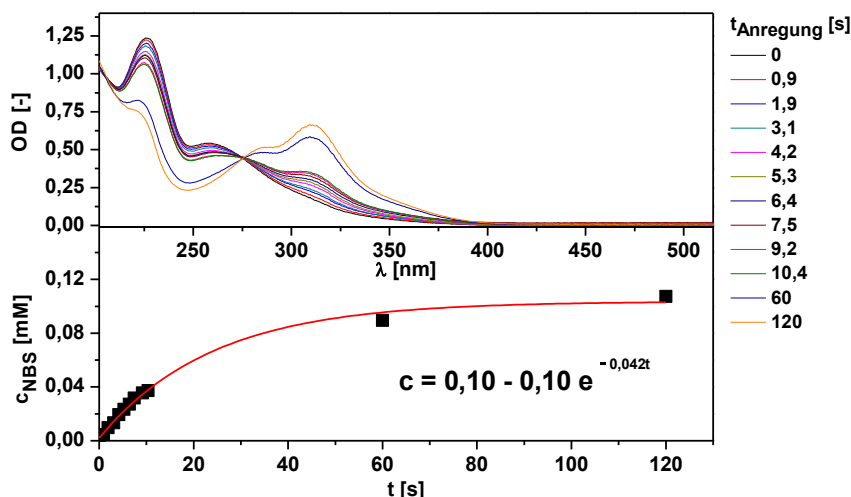
Da sich hier bei allen betrachteten Wellenlängen lineare Zusammenhänge ergeben, kann man davon ausgehen, dass im betrachteten Zeitregime nur eine linear unabhängige Reaktion erfasst wird. Bestätigt wird dies durch den bereits untersuchten Mechanismus, der zuvor in Abschnitt 2.2.2 näher erläutert wurde. Vom Mechanismus ist bekannt, dass die auftretenden Zwischenprodukte sehr kurzlebig sind und Lebensdauern im Femto- bis Nanosekunden-Bereich besitzen. [Heinz *et al.*, 2008; Donten *et al.*, 2011]



**Abbildung 27.** Zeitliche Verfolgung der photolytischen Umsetzung bei 226 nm für das Photosubstrat 2-Nitrobenzaldehyd und bei 310 nm für das Photoprodukt 2-Nitrosobenzoessäure

Im Folgenden wird nun die Kinetik der photochemischen Umsetzung betrachtet: In der Literatur wird bei experimentellen Bedingungen geringer Absorption ( $OD \ll 1$ ) eine Kinetik 1. Ordnung diskutiert, während bei Bedingungen hoher Absorption, bei Konzentrationen von 100 mM, eine Kinetik 0. Ordnung zugrunde gelegt werden kann. [Galbavy *et al.*, 2010] Unter den gewählten Bedingungen, dass heißt einer Konzentration an 2-Nitrobenzaldehyd von 100  $\mu\text{M}$ , beträgt die Absorption bei der Anregungswellenlänge von 265 nm vor Beginn der Anregung ca. 0,5. Daher erfolgt an dieser Stelle die kinetische Auswertung über eine Reaktion 1. Ordnung. Die Auftragung der ermittelten Konzentrationsverläufe über die Zeit liefert einen exponentiellen Zusammenhang (Abbildung 27). Die Anpassung der Messwerte an eine Kinetik 1. Ordnung ergibt für die Betrachtung der Eduktabnahme eine Geschwindigkeitskonstante von  $k = 0,0044 \text{ s}^{-1}$  und für die Produktzunahme  $k = 0,0048 \text{ s}^{-1}$ . Beide Geschwindigkeitskonstanten zeigen damit eine gute Übereinstimmung.

Um zu testen, ob eine Anregung bei höheren Wellenlängen ebenso möglich ist, wurde auch die Photolyse unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 388 nm durchgeführt. Hier ist die Absorption durch 2-Nitrobenzaldehyd nur noch sehr gering (vgl. Abbildung 66 im Anhang), was die Ausnutzung des eingestrahlichten Lichtes signifikant senkt. Jedoch kann Licht mit 388 nm, als zweite Harmonische der Ausgangsfrequenz des Ti-Saphir-Lasers, mit einer deutlich höheren Leistung erzeugt werden.



**Abbildung 28.** Zeitliche Verfolgung der photolytischen Umsetzung bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm mit  $P = 48$  mW; zeitliche Verfolgung der Absorptionsspektren (oben); Konzentration des entstehenden Photoproduktes 2-Nitrosobenzoessäure (unten)

In Abbildung 28 ist analog zu Abbildung 25 und Abbildung 27 die zeitliche Verfolgung der Photolyse von 2-Nitrobenzaldehyd dargestellt. Beim Vergleich zu den vorherigen Messreihen wird ersichtlich, dass trotz der geringeren Absorption der Anregungswellenlänge durch das 2-NBA, die Geschwindigkeitskonstante (hier nur über das entstehende Photoprodukt bestimmt) der Umsetzung um das 10fache ansteigt. Berechnet man unter Berücksichtigung der Energie der Anregungswellenlänge, der Laserleistung und der Absorption bei der Anregungswellenlänge die Anzahl theoretisch absorbierter Photonen, so ergibt das für den vorher beschriebenen Aufbau von 265 nm mit 220  $\mu$ W eine Anzahl von rund  $2 \cdot 10^{14}$  Photonen. Für den hier betrachteten Aufbau mit 388 nm Anregungswellenlänge und 48 mW ergibt sich eine Anzahl von  $1,5 \cdot 10^{15}$  Photonen. Das bedeutet, dass die etwa 10fache Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante den Zuwachs an Photonen widerspiegelt.

In der Konsequenz bedeutete das für die Experimente, dass die Anregungswellenlänge, die mit 200fach höherer Leistung generierbar ist, der Anregungswellenlänge mit höherer Absorption (um Faktor 60) durch das Substrat vorzuziehen war.

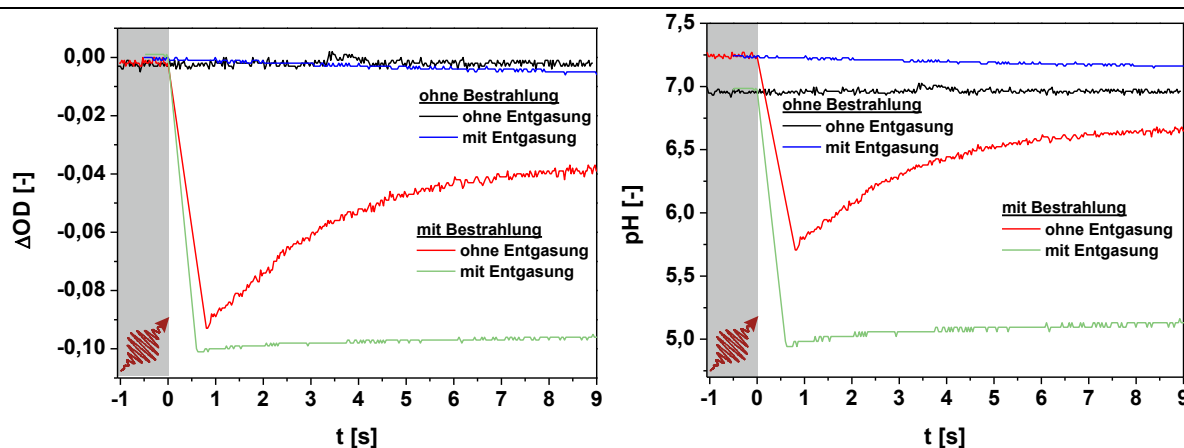


#### 4.1.2. pH-Sprunggenerierung und Optimierung des pH-Sprungsystems

Aus dem Vergleich der photolytischen Umsetzungen mit beiden bislang getesteten Anregungswellenlängen wurde für die pH-Sprunggenerierung eine Anregungswellenlänge von 388 nm verwendet. Dabei wurden hinsichtlich der pH-Sprungoptimierung verschiedene Parameter variiert.

Das Ziel dieser Optimierung war die Erzeugung eines ausreichend großen und stabilen pH-Sprunges von ca. 2-3 pH-Einheiten in einer möglichst minimalen Anregungszeit. Für alle Experimente wurde eine 500  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehydlösung eingesetzt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Zur Detektion des pH-Sprunges wurde Fluorescein als Indikator verwendet. Dies zeigt für die Betrachtung der Absorption am Maximum von 490 nm ein vorteilhaftes pH-abhängiges Verhalten, da sich der über mehrere pH-Einheiten erstreckende Umschlagbereich mit dem geplanten pH-Sprung deckt (vgl. Abschnitt 6.5.1).

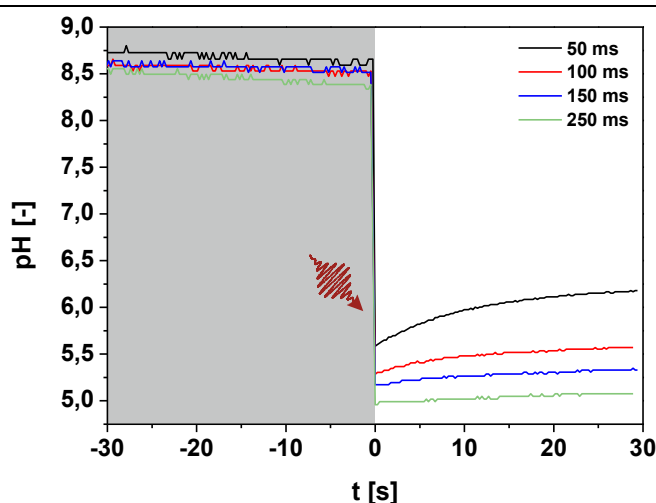
In Abbildung 29 wird die zeitliche Verfolgung der gemessenen Absorption bei 490 nm und des sich daraus ergebenden pH-Wertes während der Bestrahlungsexperimente dargestellt. Dabei wurde neben dem eigentlichen pH-Sprungexperiment auch eine Referenzprobe ohne Bestrahlung vermessen um die Möglichkeit einer Instabilität des 2-Nitrobenzaldehydes auszuschließen. In den Untersuchungen zeigte sich, dass eine sprunghafte Änderung des pH-Wertes durch die Bestrahlung unter den gewählten Bedingungen bei 388 nm möglich ist. Jedoch ist, wie die roten Kurven zeigen, in der Reaktionslösung kein stabiler pH-Wert nach dem pH-Sprung im Bereich von 10 s gewährleistet.



**Abbildung 29.** Zeitliche Verfolgung des laserinduzierten pH-Sprunges über die Absorptionsänderung des Fluoresceins bei 490 nm (links) und den pH-Wert (rechts) (500  $\mu\text{M}$  2-NBA + 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein wässrig mit 0,1 % EtOH;  $\lambda_{\text{exc}}$  = 388 nm;  $t_{\text{exc}}$  = 0,6 s;  $P_{\text{Laser}}$  = 18 mW (ohne Entgasung) bzw. 50 mW (mit Entgasung))

Der beobachtete Anstieg der Absorption ist zurückzuführen auf das in der wässrigen Lösung befindliche  $\text{CO}_2$ .

Durch dieses Puffersystem werden die photolytisch freigesetzten Protonen durch die Bildung freier Kohlensäure, wieder abgefangen und der pH-Wert steigt nach dem Sprung von ursprünglich 5,7 auf 6,7 um eine pH-Einheit an. Das in der Lösung vorhandene  $\text{CO}_2$  lässt sich durch einen Gasstrom aus der Lösung austreiben [Abbruzzetti *et al.*, 2001], so dass das Strippen der Proben mit Argon über zwei Stunden zu nahezu konstanten pH-Werten in den pH-Sprungexperimenten führte (vgl. Abbildung 29, grüne Kurve). Durch die erweiterte Probenvorbereitung und eine Erhöhung der Laserleistung konnte via Bestrahlung über 0,6 s ein pH-Sprung von 7,0 bis auf initial 5,0 erreicht werden. Nach dem eigentlichen Sprung kam es lediglich zu einem geringfügigen Anstieg auf einen pH-Wert von 5,13.

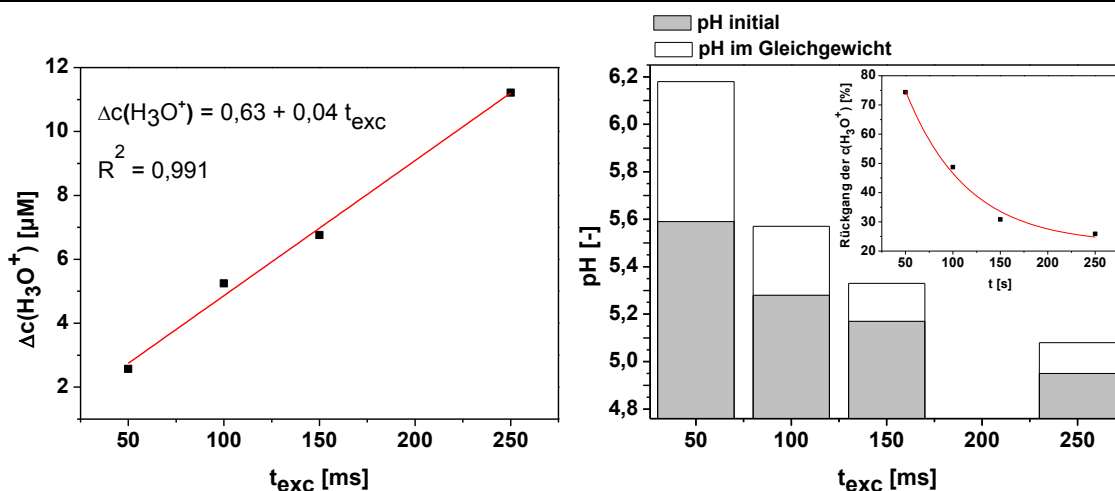


**Abbildung 30.** pH-Sprungverhalten des 2-Nitrobenzaldehydes in Abhängigkeit der Anregungszeit (500  $\mu\text{M}$  2-NBA + 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein wässrig mit 0,1 % EtOH;  $\lambda_{\text{exc}}$  = 388 nm;  $t_{\text{exc}}$  = 50 ms–250 ms;  $P_{\text{Laser}}$  = 160 mW; Entgasung im Argonstrom)

Nachdem es möglich war, einen stabilen pH-Sprung zu erzeugen, wurde die Zeit der Bestrahlung variiert. Das Ziel war es dabei, die minimale Anregungszeit zu ermitteln, die für den benötigten pH-Sprung erforderlich war. Hierbei wurden Anregungszeiten zwischen 50 und 250 ms untersucht. Die resultierenden pH-Sprünge sind in Abbildung 30 zusammengefasst. Wie erwartet steigt die Größe des laserinitiierten pH-Sprunges mit der Anregungszeit an. Bei einer maximalen Anregungszeit von 250 ms resultiert aus der Bestrahlung ein pH-Sprung von 3,5 pH-Einheiten, während sich bei minimal 50 ms initial ein pH-Sprung von 2,5 pH-Einheiten ausbildet. Es zeigt sich für die anfänglich ermittelten pH-Werte ein linearer Zusammenhang zwischen der Zeit der Anregung und der Anzahl effektiv freigesetzter Protonen (Abbildung 31).

Darüber hinaus ist aber zu sehen, dass in Abhängigkeit der Anregungszeit der pH-Wert nach dem eigentlichen Sprung erneut ansteigt. Dieser Anstieg ist bei höheren Anregungszeiten von 250 und 150 ms, mit rund 0,1 pH-Einheiten, eher gering und damit akzeptabel. Jedoch sieht man bei geringeren Anregungszeiten eine wachsende Tendenz der pH-Zunahme bis zu maximal 0,6 pH-Einheiten.

Es ist bekannt, dass die Prozesse der photolytischen Umwandlung im Bereich von Picosekunden stattfinden und die Dissoziation der entstehenden Säure im Bereich von wenigen Nanosekunden erfolgt. [Donten *et al.*, 2011] Darüber hinaus ist auch die Protonenübertragung auf Indikatoren wie z. B. Bromkresolgrün, die sich im ns-Bereich vollzieht, bekannt. [Abbruzzetti *et al.*, 2004] In der photolytischen Umsetzung und der Protonenfreisetzung kann also nicht die Ursache des instabilen pH-Wertes liegen.



**Abbildung 31.** pH-Sprungverhalten des 2-Nitrobenzaldehydes initial und im Gleichgewicht in Abhängigkeit der Anregungszeit (500  $\mu M$  2-NBA + 3  $\mu M$  Fluorescein wässrig mit 0,1% EtOH;  $\lambda_{exc} = 388$  nm;  $t_{exc} = 50$ –250 ms;  $P_{Laser} = 160$  mW; Entgasung im Argonstrom)

Zudem befinden sich in der Reaktionslösung neben dem Fluorescein keine weiteren Komponenten, die eine Pufferkapazität besitzen. Die Gründe hierfür sind vielmehr in den apparativen Details zu suchen. Der Strahlengang der Anregung wurde derart ausgerichtet, dass die Küvette nahezu vollständig ausgeleuchtet sein sollte. Die Ausleuchtung des Probenvolumens stellt einen Kompromiss aus der maximal erreichbaren Anregungsleistung und dem Strahlprofil bzw. dem Küvettenprofil dar und ist daher nicht vollständig. So ist ein geringer Teil des Probenvolumens, in der Regel der obere Teil des Meniskus, nicht ausgeleuchtet. Darüber hinaus sind auch Inhomogenitäten im Intensitätsprofil des Strahlquerschnittes nicht auszuschließen. So ist zu vermuten, dass eine Rückvermischung von un- bzw. vermindert bestrahlter Lösung stattfindet, die in der leichten Erhöhung des pH-Wertes resultiert.

In allen Versuchen zwischen 50 und 250 ms Anregungszeit konnte ein vergleichbarer Rückgang der Hydroniumionenkonzentration von ca. 2 bis  $3 \cdot 10^{-6}$  mol/L festgestellt werden. Betrachtet man jedoch den Rückgang der Hydroniumionenkonzentration prozentual auf die erzeugte Konzentration bezogen, so sinkt diese. Während bei einer Anregungszeit von 50 ms ein Rückgang der erzeugten Hydroniumionenkonzentration von 74 % beobachtet werden kann, strebt dieser bei Erhöhung der Anregungszeit einem Sättigungsbereich von etwa 22 % entgegen.

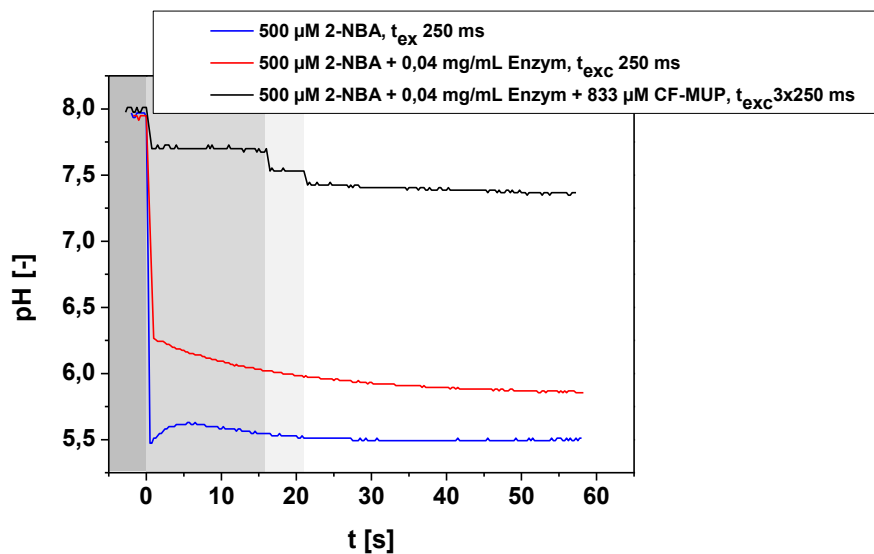
Die bestrahlte Probenfläche ist rechteckig mit den Maßen von 2 mm in der Breite und 3 mm in der Höhe. Bei Annahme eines symmetrischen kreisrunden Strahlprofils führt die Vergrößerung des Strahldurchmessers über 3 mm hinaus zu einer erheblichen Erhöhung des Leistungsverlustes. Daher wurden eine Rückvermischung der Probe und damit ein geringfügiger Verlust an Protonen gegenüber einem erhöhten Leistungsverlust in Kauf genommen.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse mit der bestehenden Literatur, so stellt man fest, dass zum einen die in der Literatur verwendete Anregungswellenlänge, sowie der Start-pH-Wert von den hier verwendeten Bedingungen abweichen. In bereits bekannten Experimenten von z. B. Abbruzzetti *et al.* wurden pH-Sprungexperimente für die Untersuchung von Faltungsprozessen proteinogener Systeme mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm durchgeführt. Der pH-Sprung wurde dabei ausgehend vom neutralen pH-Wert bis in das stark saure pH-Milieu generiert. [Abbruzzetti *et al.*, 2004]. Andere Arbeiten zur Analyse von Faltungsprozessen, die einen pH-Sprung ausgehend von einem ähnlichen pH-Milieu (pH 8–8,5) erzeugen, verwenden für die pH-Sprunggenerierung eine Anregungswellenlänge von 266 bzw. 308 nm. [Causgrove und Dyer, 2006] Daher soll ein Vergleich zu anderen Arbeiten noch zurückgestellt werden.

Berechnet man den unter den experimentellen Bedingungen theoretisch realisierbaren pH-Wert (Berechnung vergleichend Abschnitt 3.3.2 Gleichung 5 und 6), so liegt dieser für 250 ms Anregungszeit bei pH 4,6. Unter Berücksichtigung eines praktisch realisierten pH-Wertes von 5,0 bedeutet das, dass lediglich 40 % der theoretisch freisetzbaren Protonen zum tatsächlich detektierbaren pH-Sprung beitragen. Innerhalb der Berechnung wurden Energieverluste durch den nicht vollständig genutzten Querschnitt des Anregungsstrahls berücksichtigt. Sowohl die Quantenausbeute der photolytischen Umsetzung, als auch die unvollständige Deprotonierung der entstehenden Säure wurden als weitere Faktoren für eine Verminderung der Protonenfreisetzung in der Rechnung berücksichtigt. Auch gelöstes CO<sub>2</sub> kann nicht ausreichend als Grund nicht aufgeführt werden, da es durch einen Inertgasstrom weitestgehend aus der Lösung entfernt wurde. Eine mögliche Erklärung für die Limitierung des erreichbaren pH-Wertes können erneut Effekte der Rückvermischung sein. So ist es möglich, dass auch bei einer Anregungszeit von 250 ms eine Rückvermischung un- bzw. vermindert bestrahlter Lösung stattfindet, jedoch in einem kürzeren Zeitregime als der gewählten Zeitauflösung der Messung von 250 ms. Eine daraus resultierende Erhöhung des pH-Wertes würde somit nicht detektiert und nur durch die Limitierung des pH-Wertes registriert werden. Um dies zu prüfen wurde das Diffusionsverhalten der Protonen bzw. Hydroniumionen in der wässrigen Lösung näher untersucht. Details der Berechnungen befinden sich im Anhang unter Abschnitt 6.5.9. Die Betrachtungen zeigen, dass für die Argumentation des detektierten Anstieges im Sekunden-Bereich Diffusionseffekte plausibel sind.

Jedoch ist im Zeitregime von Millisekunden ein Einfluss von Diffusionseffekten als Grund für den Anstieg des pH-Wertes auf dieser Zeitskala unwahrscheinlich.

Die Komponenten des enzymatischen Systems, d. h. das Enzym und sein Substrat haben aufgrund der Existenz protonierbarer Gruppen Einfluss auf den maximal erreichbaren pH-Sprung im gesamten Reaktionsgemisch. Um die Größe des Einflusses zu bestimmen wurden dem ursprünglichen pH-Sprungsystem die Einzelkomponenten des enzymatischen Systems sukzessive zugesetzt. In Abbildung 32 wird die resultierenden Auswirkungen auf den erreichbaren pH-Sprung dargestellt.



**Abbildung 32.** pH-Sprungverhalten des 2-Nitrobenzaldehydes unter Zusatz der Komponenten des enzymatischen Systems (500  $\mu\text{M}$  2-NBA + 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein wässrig mit 0,1 % EtOH;  $\lambda_{\text{exc}} = 388 \text{ nm}$ ;  $t_{\text{exc}} = 250 \text{ ms}$ ;  $P_{\text{Laser}} = 146 \text{ mW}$ ; 0,04 mg/mL saure Phosphatase; 833  $\mu\text{M}$  CF-MUP; Entgasung im Argonstrom)

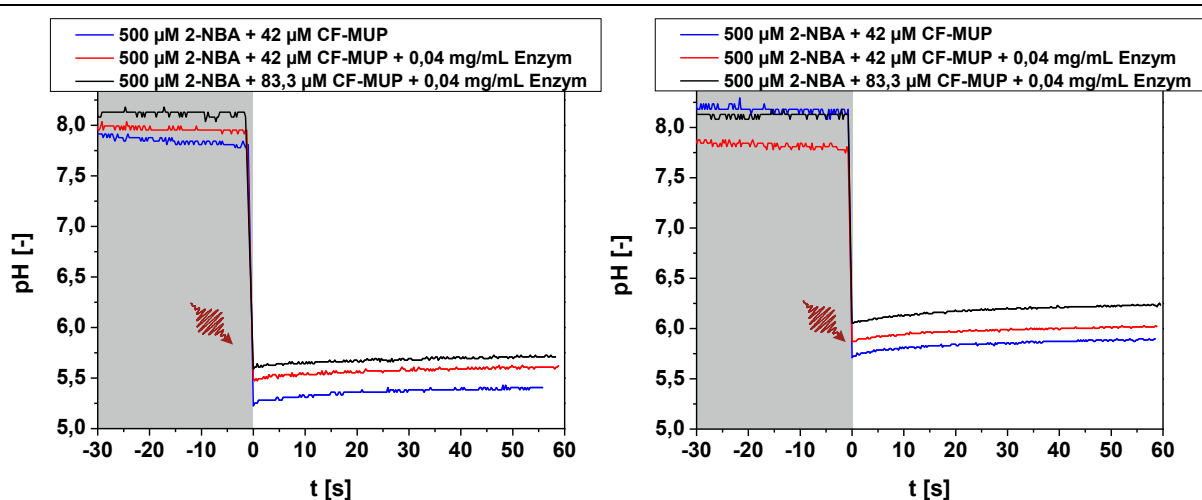
Die Zugabe von 0,04 mg/mL saurer Phosphatase, die in den bisher untersuchten enzymatischen Umsetzungen die maximal verwendete Enzymkonzentration darstellte, senkt wie erwartet den pH-Sprung. Dabei kommt es zu einer Erniedrigung des pH-Sprunges von 2,5 auf 1,7 pH-Einheiten.

Bei der Betrachtung enzymatischer Reaktionen nutzt man in der Regel Substratkonzentrationen, die die Michaelis-Menten-Konstante um ein vielfaches übersteigen, um eine Abhängigkeit der Reaktion von der sich ändernden Substratkonzentration zu vermeiden. Bereits die Zugabe einer Substratkonzentration die die Michaelis-Menten-Konstante um das Fünffache übersteigt führt zu einem beträchtlichen Rückgang des erzeugbaren pH-Sprunges (Abbildung 32). Bei einmaliger Anregung für 250 ms wird der pH-Wert lediglich um 0,3 pH-Einheiten auf pH 7,7 gesenkt, dies entspricht einer Reduktion der Protonenfreisetzung von rund 3,4  $\mu\text{M}$ . Auch bei weiterer Bestrahlung kann der pH-Wert nicht wesentlich gesenkt werden. CF-MUP besitzt mit seiner Phosphatgruppe eine protonierbare Funktionalität. Der  $pK_s$ -Wert des Esters beträgt 5,34.

Damit liegt das Substrat bei einem Start-pH-Wert von 8 zu einem großen Teil deprotoniert vor und wird bei Freisetzung der Protonen protoniert, wodurch diese dem pH-Sprung nicht mehr zur Verfügung stehen.

Da eine weitere Erhöhung der Bestrahlungszeit nicht im Interesse der Experimente liegt, muss die Substratkonzentration gesenkt werden, um einen ausreichend großen pH-Sprung zu erzeugen.

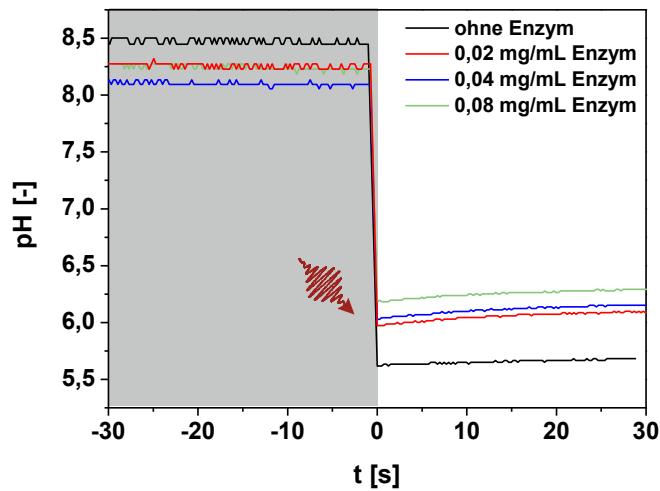
Im Folgenden ist die zeitliche Verfolgung der pH-Sprungexperimente für den Zusatz von 83,3  $\mu\text{M}$ , sowie nach weiterer Senkung auf 42  $\mu\text{M}$  CF-MUP dargestellt (Abbildung 33). Im linken Graph werden die Ergebnisse bei einer Anregungszeit von 750 ms gezeigt, während im rechten Graphen vergleichend die pH-Sprünge mit einer Anregungszeit von 250 ms abgebildet sind. Aus Abbildung 33 wird ersichtlich, dass die Senkung der Substratkonzentration zu einem ausreichend großen, stabilen pH-Sprung führt.



**Abbildung 33.** pH-Sprungverhalten im Gesamtsystem mit einer Anregungszeit von 750 ms (links) und 250 ms (rechts) (500  $\mu\text{M}$  2-NBA + 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein wässrig mit 0,1% EtOH;  $\lambda_{\text{exc}} = 388 \text{ nm}$ ;  $t_{\text{exc}} = 250\text{--}750 \text{ ms}$ ;  $P_{\text{Laser}} = 133 \text{ mW}$ ; 0,04 mg/mL saure Phosphatase; 42–83,3  $\mu\text{M}$  CF-MUP; Entgasung im Argonstrom)

Bei einer Anregungszeit von 750 ms konnte ein pH-Sprung bis auf pH 5,25 für den Zusatz von 42  $\mu\text{M}$  CF-MUP erreicht werden. Durch weitere Zugabe von 0,04 mg/mL Enzym wurde ein pH-Wert von 5,5 erzeugt. Da die Enzymaktivität für diese Substratkonzentration bei nur etwa 0,2 U/mg liegt, wurde die Konzentration des CF-MUP noch einmal auf 83,3  $\mu\text{M}$  erhöht. Damit steigt die zu erwartende Aktivität auf rund 0,4 U/mg. Auch für diese Substratkonzentration konnte der pH-Sprung erfolgreich durchgeführt werden, wobei ein Sprung bis auf einen pH-Wert von 5,75 im enzymatischen Gesamtsystem erfolgte. Da eine kurze Anregungszeit der Aktivierung dem Erreichen der maximalen Aktivität (bei pH 5,5) hier vorgezogen wurde, wurden die Versuche mit einer Anregungszeit von 250 ms wiederholt. Hier zeigte sich für das angestrebte Gesamtsystem (83,3  $\mu\text{M}$  CF-MUP + 0,04 mg/mL saure Phosphatase) ein Sprung im pH-Wert von ca. 2 pH-Einheiten auf pH 6,2.

Um den Einfluss des Enzyms auf den pH-Sprung näher zu untersuchen, wurden Experimente bei verschiedenen Enzymkonzentrationen von 0 bis 0,08 mg/mL saurer Phosphatase durchgeführt.



**Abbildung 34.** pH-Sprung-Experimente in Abhängigkeit der Enzymkonzentration ( $\lambda_{exc} = 388 \text{ nm}$ ;  $t_{ex} = 250 \text{ ms}$ ;  $P_{Laser} = 160 \text{ mW}$ ; Systeme mit  $500 \text{ } \mu\text{M}$  2-NBA +  $83,3 \text{ } \mu\text{M}$  CF-MUP + x mg/mL Enzym) – zeitliche Verfolgung des pH-Wertes über Fluorescein als pH-Indikator durch die Absorptionsverfolgung bei  $490 \text{ nm}$

In Abbildung 34 sind die pH-Sprungexperimente im Vergleich für steigende Enzymkonzentrationen dargestellt. Die saure Phosphatase besitzt neben der sauren Aminosäure Asparaginsäure auch die basischen Aminosäuren Histidin, Arginin und Cystein, sowie Tyrosin als Aminosäuren mit protonierbaren Resten. Darüber hinaus verfügt sie als Glycoprotein auch über eine Reihe von Zuckermolekülen. Die Zusammensetzung relevanter Komponenten ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass der Großteil der Komponenten einen  $pK_s$ -Wert von  $\geq 8$  besitzen.

**Tabelle 8.** Zusammensetzung relevanter Aminosäuren und Zucker der sauren Phosphatase aus der Kartoffel [Kruzel und Morawiecka, 1982; Beenackers *et al.*, 1985; Cho, 1999; Horton H. R. *et al.*, 2008]

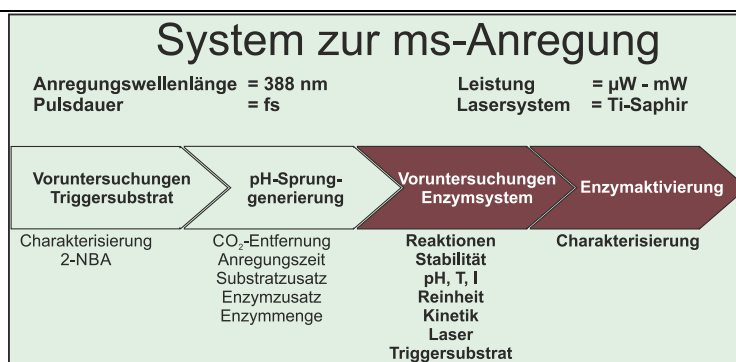
Komponente	Anteil [%]	$pK_s$
Asparaginsäure	11,98	3,9
Histidin	2,60	6,0
Arginin	3,84	12,5
Lysin	5,08	10,5
Cystein	1,37	8,4
Tyrosin	5,31	10,5
Mannose	5,6	12,08
Rhamnose	3,4	
Glucose	2,5	12,28
Galactose	1,5	12,39
Glucosamin	3,6	

Das bedeutet, dass zu Beginn der Experimente die Seitenketten bereits teilweise protoniert vorliegen. Lediglich Histidin und Asparaginsäure liegen, mit  $pK_s$ -Werten deutlich unter 8, deprotoniert vor. Zusammen stellen sie aber fast 15 % des Enzyms. Durch den pH-Sprung kommt es zur Freisetzung von Protonen die durch die deprotonierten Spezies der Aminosäuren wieder abgefangen werden.

Es ist ein starker Rückgang des pH-Sprungs durch die Zugabe des Enzyms zu beobachten. Während ohne Enzym ein pH-Wert von 5,62 erreichbar ist, kann bei Anwesenheit von 0,02 mg/mL Enzym nur noch ein pH-Wert von 5,97 erzielt werden. Durch die Verdopplung der Enzymkonzentration entsteht dann nur ein geringfügiger Rückgang um 0,06 pH-Einheiten. Bei weiterer Verdopplung sinkt der pH-Sprung noch einmal um 0,13 pH-Einheiten. Es lässt sich, unter Vernachlässigung des Referenzexperimentes ohne Enzym, ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Enzymkonzentration und den freigesetzten Protonen herstellen.

## 4.2. Untersuchungen zur laserinduzierten Enzymaktivierung

Die optische Steuerung enzymatischer Aktivität durch die sprunghafte Veränderung des pH-Wertes setzt die Wahl eines geeigneten enzymatischen Systems voraus. Dabei wird, anders als bei spezifischen Freisetzungen von z. B. ATP, nicht nur eine bestimmte Enzymklasse angesprochen. Die Wahl des verwendeten Enzyms kann also, über alle Enzymklassen hinweg, nach dem geeigneten pH-abhängigen Aktivitätsprofil erfolgen.



Im Rahmen dieser Arbeit wird das pH-abhängige Verhalten der sauren Phosphatasen für die laserinduzierte Enzymaktivierung ausgenutzt. Die verwendete saure Phosphatase zeichnet sich dabei durch ein signifikantes Aktivitätsprofil in Abhängigkeit des pH-Wertes aus. Darüber hinaus läuft die enzymatische Umsetzung ohne die Bildung von Neben- oder Folgeprodukten ab. Dies ist gerade im Hinblick auf den experimentellen Beweis der Machbarkeit des Konzeptes von entscheidendem Vorteil.



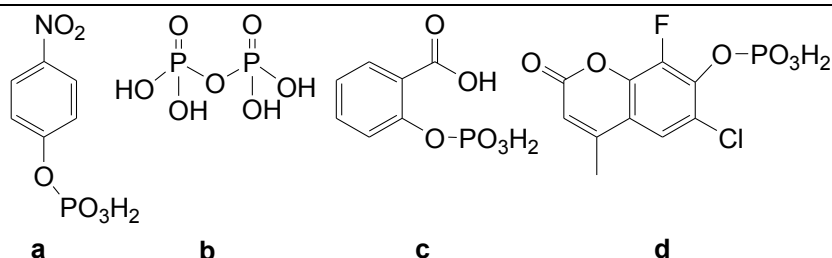
Um zukünftige Messungen optimal einstellen und beurteilen zu können erfolgte zunächst die Charakterisierung der verwendeten sauren Phosphatase Typ IV-S aus der Kartoffel hinsichtlich ihrer Aktivität und ihres Verhaltens gegenüber verschiedenen Einflussfaktoren.

#### 4.2.1. Einführung ausgewählter Reaktionen der sauren Phosphatase

Für die Wahl einer geeigneten enzymatischen Reaktion werden folgende Kriterien zu Grunde gelegt:

- i. Das Substrat sollte in ausreichendem Maße vom Enzym akzeptiert und umgesetzt werden.
- ii. Die Reaktion sollte mit spektroskopischen Analyseverfahren mit ausreichender Empfindlichkeit detektierbar sein.
- iii. Es sollten im gewählten pH-Bereich des pH-Sprunges konstante Absorptionseigenschaften des zu detektierenden Produktes vorliegen.
- iv. Die enzymatische Reaktion sollte von der Photolyse des pH-Sprunges wenn möglich unabhängig oder nur gering beeinflusst detektierbar sein.

Zur Beurteilung der Aktivität saurer Phosphatasen sind verschiedene Reaktionen gebräuchlich, wie z. B. die Hydrolyse von 4-Nitrophenylphosphat (a) oder die Spaltung von Pyrophosphat (b) (Abbildung 35). [Kruzel und Morawiecka, 1982; Sigma-Aldrich, 2012] Beide Reaktionen weisen hinsichtlich der Detektion jedoch Nachteile auf. Während bei der Verwendung von 4-Nitrophenylphosphat (a) das entstehende 4-Nitrophenolat pH-abhängig nur im basischen Milieu ein ausreichendes Absorptionsverhalten im ultravioletten Bereich aufweist, ist ein ausreichendes Absorptionsverhalten von Pyrophosphat oder Phosphat auch im sauren pH-Milieu nicht vorhanden. Damit entfällt die Nutzung der Substrate für einen kontinuierlichen photometrischen Assay.

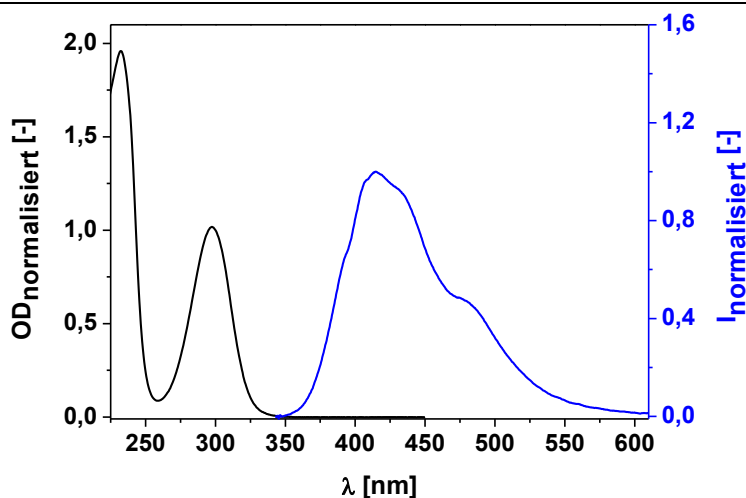


**Abbildung 35.** Substrate zur Aktivitätsbestimmung saurer Phosphatasen (a: 4-Nitrophenylphosphat; b: Pyrophosphat; c: 2-Carboxyphenylphosphat; d: CF-MUP) [Brandenberger und Hanson, 1953; Kruzel und Morawiecka, 1982; Yang *et al.*, 2008]

Die Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat (Abbildung 35, c) hingegen zeichnet sich durch konstante Absorptionseigenschaften der entstehenden Salicylsäure über einen großen pH-Bereich aus.

Diese werden durch das Vorliegen des Monoanions der Salicylsäure über einen großen pH-Bereich bedingt ( $pK_{s,COOH} \sim 3,0$  und  $pK_{s,OH} \sim 13,4$ ). [Salinas *et al.*, 1990; Pozdnyakov *et al.*, 2007] Darüber hinaus ist aus der Literatur bekannt, dass die Bildung der Salicylsäure anhand der Absorption bei 300 nm mit ausreichender Empfindlichkeit detektierbar ist. [Brandenberger und Hanson, 1953] Das Absorptionsspektrum der Salicylsäure in wässriger Lösung ist in Abbildung 36 (schwarze Kurve) gezeigt.

Der Reaktionsverlauf der hydrolytischen Umsetzung von 2-Carboxyphenylphosphat kann sowohl absorptiv als auch fluorimetrisch verfolgt werden. Das Fluoreszenzspektrum der Salicylsäure nach Anregung mit einer Wellenlänge von 265 nm ist in Abbildung 36 (blaue Kurve) dargestellt. Das Maximum der Emissionsbande liegt mit einer Wellenlänge von 415 nm nahe dem in der Literatur beschriebenen Bereich von 389 bis 412 nm. [Joshi *et al.*, 2002] Auch die große beobachtete Stokes-Verschiebung, die in der Literatur dem intramolekularen Protonentransfer von der Hydroxy- zur Carboxygruppe (ESIPT) zugeschrieben wird [Pozdnyakov *et al.*, 2007], ist mit  $9200\text{ cm}^{-1}$  vergleichbar mit den angegebenen charakteristischen Literaturwerten für das Monoanion der Salicylsäure. [Joshi *et al.*, 2002, 2003; Pozdnyakov *et al.*, 2007; Pozdnyakov *et al.*, 2009]

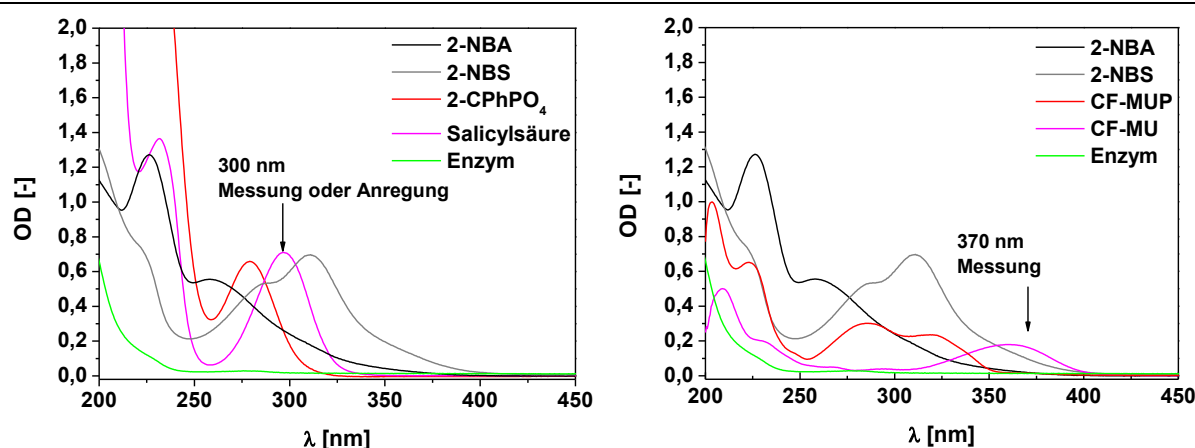


**Abbildung 36.** Absorptionsspektrum (schwarz) und Emissionsspektrum (blau;  $\lambda_{exc} = 265\text{ nm}$ ) einer wässrigen Salicylsäurelösung mit  $OD_{265\text{nm}} \leq 0,1$

Die ermittelten Fluoreszenzquantenausbeuten von  $0,14 \pm 0,02$  bei pH 4 und  $0,15 \pm 0,01$  bei pH 9 zeigen auch für die Fluoreszenz nahezu konstante Eigenschaften über den untersuchten pH-Bereich und sind ebenfalls in Übereinstimmung mit Literaturdaten. [Joshi *et al.*, 2003]

Unter den gegebenen Bedingungen, das bedeutet einer ultrakurz gepulsten Anregung bei 265 nm mit einer durchschnittlichen Laserleistung zwischen 150 bis 350  $\mu\text{W}$  zeigten sich jedoch Instabilitäten der Fluoreszenzsignale. Ein Vergleich der Absorptionsspektren vor und nach der Anregung deutet auf eine Zersetzung der Salicylsäure hin (Abbildung 65 im Anhang). In der Literatur wird für die Salicylsäure eine lichtinduzierte Umwandlung zu Dihydroxybenzolen oder -benzoesäuren in Gegenwart von Sauerstoff diskutiert. [Kalyanaraman *et al.*, 1993; Scheck und Frimmel, 1995]

Für die Stabilitätsuntersuchungen des Enzyms unter Bestrahlung hat dies jedoch keinen negativen Einfluss, da dieser quantifizierbare Zersetzungseffekt bei der Auswertung berücksichtigt werden konnte. Die Hydrolyse des 2-Carboxyphenylphosphates erwies sich für die Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen und damit für die Charakterisierung des Enzyms als geeignet, für den Einsatz in den Aktivierungsexperimenten stellte sich die Verfolgung der Reaktion jedoch als problematisch heraus, was im Folgenden näher erläutert wird. Daher wurde eine zweite Reaktion zur Untersuchung der hydrolytischen Aktivität herangezogen. Hierbei handelt es sich um die Reaktion von 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferonphosphat (CF-MUP, Abbildung 35 d) zu 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferon (CF-MU). Diese Reaktion wurde für die Analyse der Aktivität saurer Phosphatasen als fluorimetrischer Assay entwickelt um dort bestehende Lücken zu füllen. [Yang *et al.*, 2008] Bis dahin etablierte Assay-Reaktionen zeigten lediglich im basischen Milieu ein ausreichend empfindliches Fluoreszenzverhalten. Dies führte dazu, dass eine kontinuierliche fluorimetrische Reaktionsverfolgung der sauren Phosphatasen nicht möglich war. Durch die Derivatisierung des klassischen Substrates 4-Methylumbelliferonphosphat konnten die spektralen Eigenschaften derart verändert werden, dass das CF-MUP eine empfindliche und nahezu konstante Fluoreszenz zeigt.



**Abbildung 37.** Absorptionsspektren der Reaktionsgemische des pH-Sprungsystems (schwarze Linie 100  $\mu\text{M}$  2-NBA, graue Linie 2-NBS nach der Photolyse; rote Linie 500  $\mu\text{M}$  2-Carboxyphenylphosphat bzw. 84  $\mu\text{M}$  CF-MUP; pinke Linie 200  $\mu\text{M}$  Salicylsäure bzw. 14  $\mu\text{M}$  CF-MU; grüne Linie 0,021 mg/mL saure Phosphatase)

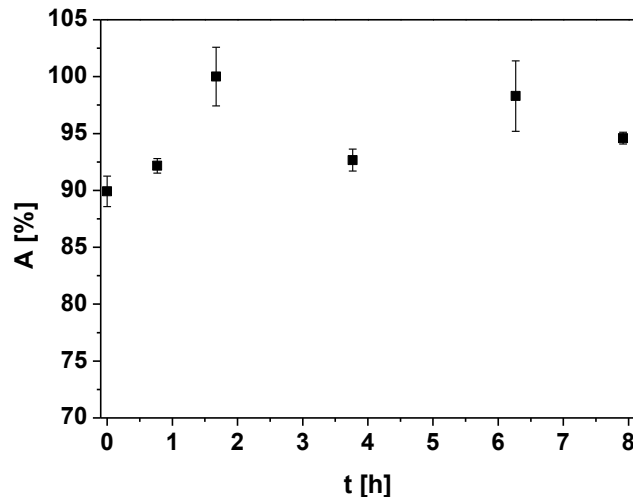
Vergleicht man die beiden, in Abbildung 37 gegenübergestellten, Reaktionsgemische, so erkennt man deutlich den Vorteil des CF-MUP gegenüber 2-Carboxyphenylphosphat in den pH-Sprungexperimenten. Für das Gesamtsystem mit 2-Carboxyphenylphosphat ist eine starke Überlagerung der Absorptionen von Enzym- und photolytischem pH-Sprungsystem zu erkennen.

Das zu detektierende Produkt der CF-MUP (Abbildung 37, rechts) Hydrolyse zeigt hingegen eine im Vergleich zur Salicylsäure (Abbildung 37, links) rotverschobene Absorptionsbande. Dadurch ist es möglich die Interferenzen mit den Absorptionsänderungen der Photoumsetzung zu verringern. Darüber hinaus führt eine kontinuierliche Bestrahlung der Probe mit kurzwelligem UV-Licht für die Detektion zur Umsetzung an Triggersubstrat und somit instabilen pH-Verhältnissen sowie zur Zersetzung der Salicylsäure (Abbildung 65 im Anhang). Dies konnte durch die Verwendung einer Detektionswellenlänge von 370 nm, also von UV-Strahlung im langwelligen Bereich, ebenfalls unterdrückt werden.

#### **4.2.2. Die Aktivität der sauren Phosphatase unter Berücksichtigung verschiedener Einflussfaktoren**

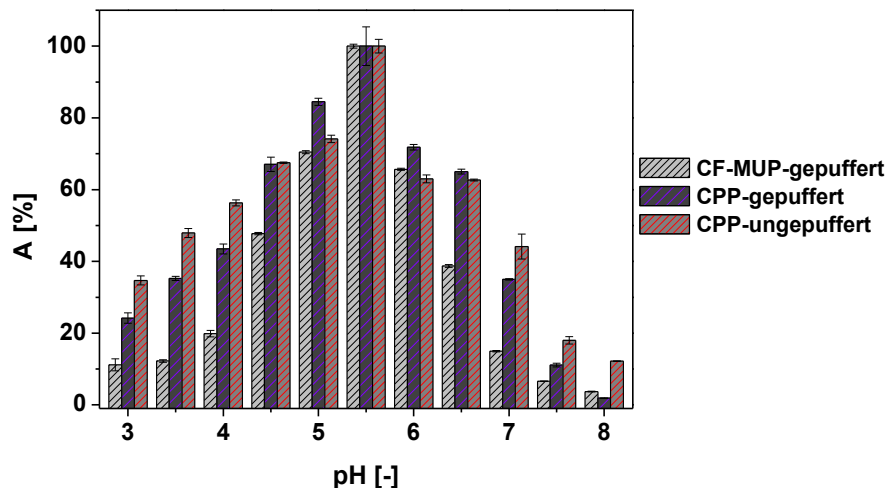
Enzyme sind Katalysatoren, die unter „milden“ Reaktionsbedingungen arbeiten. Dies bedeutet aber auch, dass allgemeine Reaktionsbedingungen wie die Temperatur, der pH-Wert und die Ionenstärke die Aktivität entscheidend beeinflussen. Daneben existieren im Hinblick auf die pH-Sprungexperimente weitere spezifische Problemstellungen, z. B. die Stabilität des Enzyms bei basischen pH-Werten, sowie der Einfluss der Laserstrahlung und der Triggersubstrate auf die enzymatische Aktivität. Die Untersuchung dieser Parameter und die speziell die pH-Sprungexperimente betreffenden Schlussfolgerungen werden im Folgenden ausgeführt.

Um die Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurden zunächst Stabilitätsmessungen durchgeführt. Diese hatten das primäre Ziel das Zeitfenster zu ermitteln, in dem eine konstante Aktivität des gelösten Lyophilisates sichergestellt ist. Innerhalb einer Inkubationszeit von zwei Stunden ist ein leichter Anstieg der Aktivität zu beobachten, wie in Abbildung 38 gezeigt wird. Danach schwanken die Werte im Bereich von 7 %, zeigen aber keine Tendenz im zeitlichen Verlauf. Da die Schwankungen in der Größenordnung der Standardabweichungen liegen, kann für die weiteren Messungen davon ausgegangen werden, dass nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden stabile Aktivitäten für weitere sechs Stunden gewährleistet sind.



**Abbildung 38.** Thermische Stabilität der Phosphatase bei 25 °C (Inkubation: 25 °C; 1mg/mL Phosphatase in Reinstwasser; Assay: Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat; T = 25 °C; Acetatpuffer pH 5)

Um das Potenzial der lichtinduzierten Aktivitätssteuerung via des pH-Wertes zu ermitteln, wurde zunächst das pH-Profil der Phosphatase unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. In Abbildung 39 wird das typische Verhalten einer sauren Phosphatase mit einem Aktivitätsmaximum im sauren Bereich gezeigt. [Marzadori *et al.*, 1998] Die Hydrolyse durch die Phosphatase Typ IV-S aus der Kartoffel zeigt für gepufferte sowie ungepufferte Lösungen ihre maximale Aktivität bei einem pH-Wert von 5,5. Dies wurde für beide untersuchten Phosphatester beobachtet.

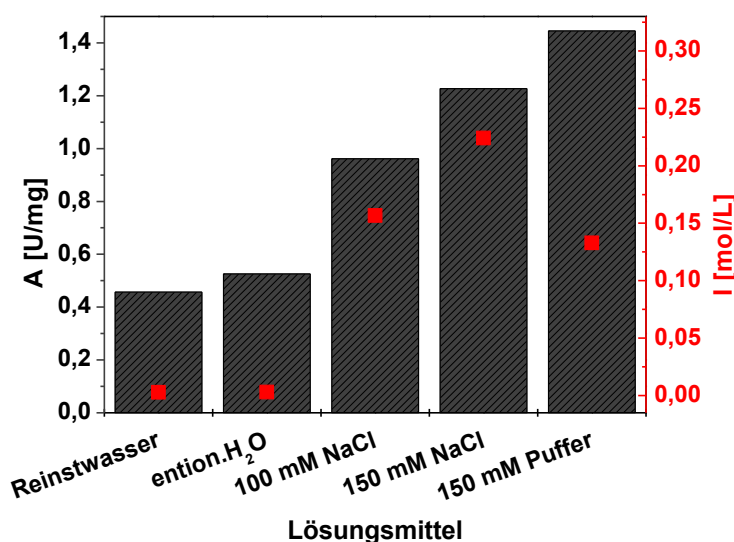


**Abbildung 39.** pH-Profil der sauren Phosphatase aus der Kartoffel bei variierendem Substrat und Medium (Inkubation bei T = 25 °C; Assay: Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat (CPP) bzw. CF-MUP; 0,02–0,08 mg/mL Phosphatase; T = 25 °C; 150 mM Acetatpuffer; 150 mM TRIS-Puffer und 150 mM Boratpuffer; bzw. entionisiertes Wasser eingestellt mit NaOH oder HCl)

Oft besteht ein großer Einfluss der Puffersalze auf die Aktivität von Enzymen, der durch die Untersuchung ungepufferter Lösungen an dieser Stelle berücksichtigt werden soll.

Es zeigt sich, dass das grundlegende pH-abhängige Verhalten der Phosphatase in ungepufferten Lösung dem gepufferten System gleicht. Auch hier liegt die maximale Aktivität, wie bereits erwähnt, bei einem pH-Wert von 5,5. Allerdings weichen die Aktivitäten im sauren Milieu gegenüber dem gepufferten System stark ab. Hier resultieren im ungepufferten System um ca. 10 % höhere Aktivitäten. Auch im basischen Milieu ist eine leicht erhöhte Aktivität des Enzyms im ungepufferten System zu beobachten. In der Konsequenz bedeutet das, dass für die Aktivierungsexperimente ein pH-Wert vor der Anregung von pH 8 bis 8,5 anzustreben ist.

Wie bereits erwähnt, ist die Aktivität nicht allein vom pH-Wert abhängig. Eine zusätzliche Abhängigkeit der Enzymaktivität von der variierenden Ionenstärke kann nicht ausgeschlossen werden. Um den Einfluss der Ionenstärke auf die Enzymaktivität zu bestimmen, wurden Messungen in Reinstwasser (0,06  $\mu$ S), in entionisiertem Wasser (0,1  $\mu$ S), in 100 und 150 mM NaCl-Lösung sowie 150 mM Acetatpufferlösung miteinander verglichen. In Abbildung 40 ist der deutliche Einfluss der Ionenstärke bzw. des Reaktionsmediums zu erkennen. Während die Aktivität in Reinstwasser lediglich 0,46 U/mg beträgt, steigt sie bereits in entionisiertem Wasser als Reaktionsmedium an. Hier ist zunächst nur ein geringfügiger Anstieg von ca. 15 % auf 0,53 U/mg zu beobachten. Die Hydrolysereaktion in Salz- bzw. Pufferlösung ist mit 1,45 U/mg sogar etwa dreimal so hoch.



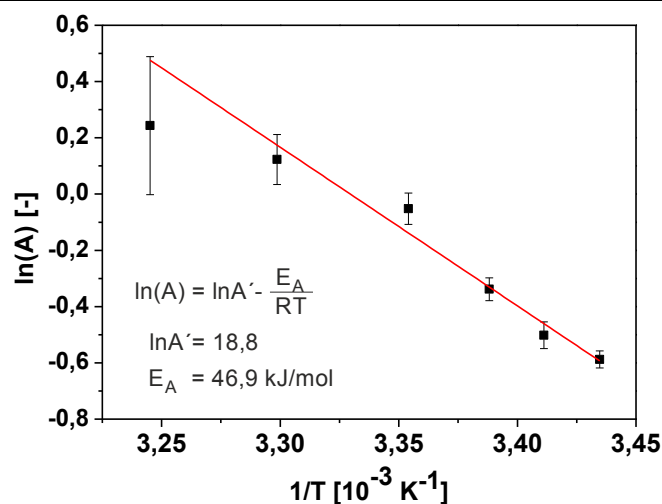
**Abbildung 40.** Einfluss der Ionenstärke auf die Aktivität der sauren Phosphatase (Inkubation:  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Assay: Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat;  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 0,04 mg/mL Phosphatase; Lösungsmittel: Reinstwasser; entionisiertes Wasser und NaCl-Lösung; deren pH-Wert mit NaOH und HCl auf 5,5 eingestellt wurde sowie Acetatpuffer pH 5,5; die Ionenstärken wurden empirisch aus den ermittelten Leitfähigkeiten der Substratlösungen errechnet, Abschnitt 6.5.5 im Anhang)

Ein direkt linearer Zusammenhang zwischen der Ionenstärke und der Aktivität wurde dabei nicht beobachtet. Neben der Ionenstärke ist scheinbar auch die Art des Anions bedeutsam für die Enzymaktivität.

Der Einfluss von Kationen auf die enzymatische Aktivität ist für die saure Phosphatase bekannt und bereits beschrieben. So ist für fast alle Pyrophosphatasen eine aktivierende Wirkung bei Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen, hingegen eine deaktivierende Wirkung für die Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Ionen bekannt. [Latzko, 1967; Tanemura und Yoshino, 2006] Beim Vergleich der Aktivität in der 150 mM Natriumchloridlösung mit der Aktivität in der 150 mM Pufferlösung, lässt sich ein weiterer Anstieg erkennen. In der Pufferlösung liegt aufgrund des Dissoziationsgrades eine etwas geringere Ionenstärke vor. Da in beiden Medien lediglich Natriumionen als Kationen vorliegen, ist ein zusätzlicher aktivierender Einfluss des Acetatanions wahrscheinlich.

Um innerhalb der pH-Sprungexperimente, trotz der Abwesenheit eines Puffersystems, eine konstante Ionenstärke zu gewährleisten, wurde als Reaktionsmedium in allen Experimenten eine 150 mM NaCl-Lösung verwendet.

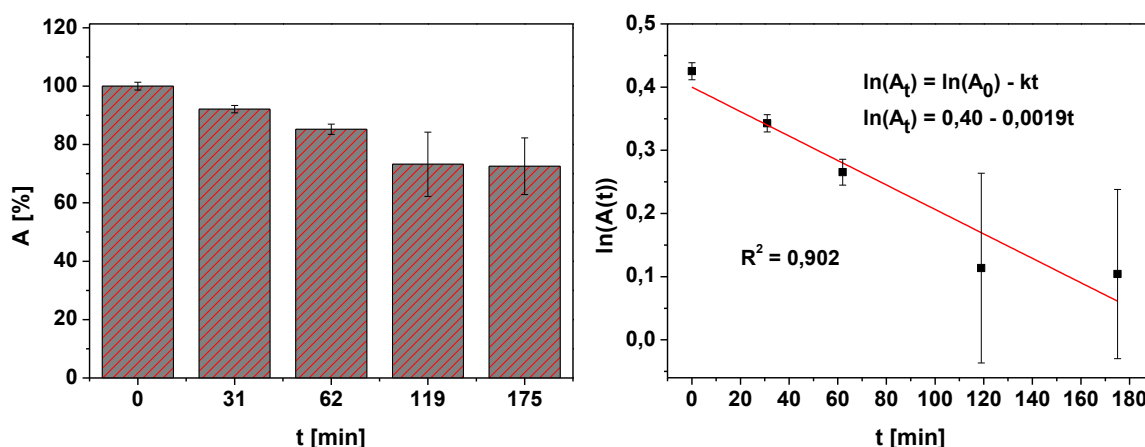
Um den Einfluss von Temperaturschwankungen durch z. B. temporäre Erhitzung der Proben zu ermitteln, wurde die Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 18 °C bis 35 °C ermittelt. In diesem Temperaturbereich zeigt die saure Phosphatase ein für Enzyme typisches Verhalten. Die hydrolytische Aktivität weist dabei eine exponentielle Abhängigkeit zur Temperatur auf, die durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben werden kann. [Segel, 1993; Gutfreund, 1995] In Abbildung 41 ist zur Illustration die linearisierte Form der Arrhenius-Gleichung dargestellt. Für die Reaktion konnte eine Aktivierungsenergie von etwa 47 kJ/mol ermittelt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass bereits ab 40 °C Aktivitätsverluste für die Phosphatase zu beobachten sind. [Marzadori *et al.*, 1998] Ein ähnliches Verhalten zeichnet sich auch aus den vorgestellten Untersuchungen ab. Daher ist darauf zu achten, dass eine kurzfristige Überhitzung der Probe vermieden wird.



**Abbildung 41.** Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der sauren Phosphatase (Inkubation:  $T = 25\text{ °C}$ ; Assay: Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat; 0,04 mg/mL Phosphatase;  $T = 18\text{--}35\text{ °C}$ ; Acetatpuffer pH 5,5)

Für den späteren Einsatz der Phosphatase in den pH-Sprungexperimenten muss gewährleistet sein, dass das Enzym nach Inkubation bei pH 8 reversibel ihre ursprüngliche Aktivität erreichen kann. Dazu wurde das Enzym bei pH 8 inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten diese Enzymlösung wieder auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Die Aktivität wurde in einem Standardassay analysiert, um zu ermitteln ob und in welchem Maß eine irreversible Desaktivierung aus der Inkubation folgt (Abbildung 42).

Wie auf Seite 59 bereits ausgeführt wurde, besitzt das Enzym bei einem pH-Wert von 8 lediglich eine 10 %-ige Restaktivität bezogen auf die maximale Aktivität. Die Messungen zeigen dabei, dass diese Desaktivierung als partiell reversibel anzusehen ist. In Abbildung 42 sind die Aktivitäten dargestellt, die nach erneuter Einstellung eines pH-Wertes von 5,5 resultieren. Es ist festzustellen, dass das Enzym hierbei eine Restaktivität von maximal 92 % aufweist. In der Konsequenz bedeutet das, dass die Ausgangsaktivität nicht vollständig wieder hergestellt werden kann.



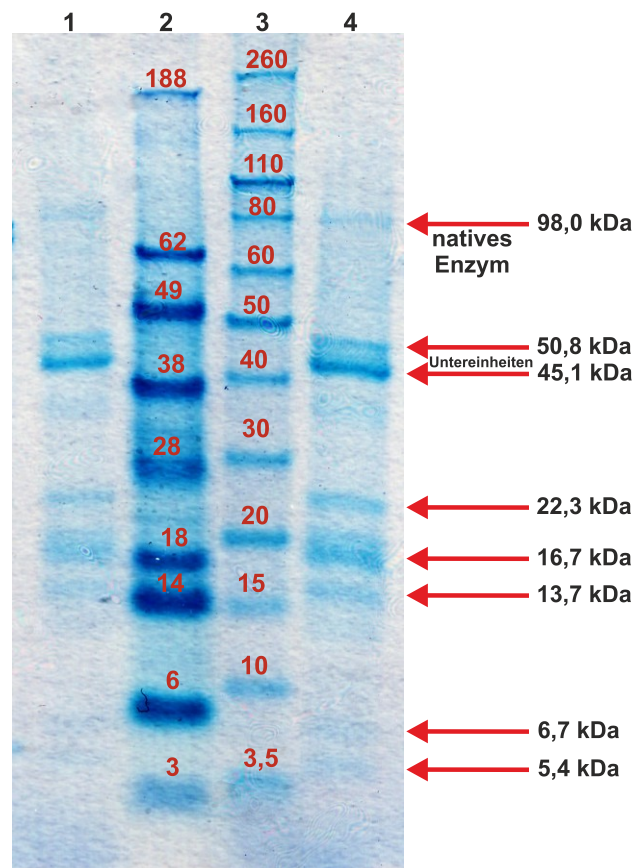
**Abbildung 42.** Stabilität der sauren Phosphatase im basischen Milieu (Inkubation:  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; TRIS-Maleat-Puffer pH 8; Assay: Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat; 0,04 mg/mL Phosphatase verdünnt in Acetatpuffer pH 5,5;  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Acetatpuffer pH 5,5 mit End-pH im Assay von 5,5)

Betrachtet man die Stabilität des Enzyms über einen Zeitraum von drei Stunden, so ist eine zunehmende Desaktivierung des Enzyms erkennbar. Bei Annahme einer Desaktivierung erster Ordnung konnte eine Halbwertszeit von 365 Minuten ermittelt werden. Nach zwei bis drei Stunden besitzt das Enzym noch eine Restaktivität von rund 70 % der Ausgangsaktivität. Es konnte folglich gezeigt werden, dass die zeitlich aufwendige Probenvorbereitung und damit Inkubationszeit im basischen Bereich für das Enzym verträglich ist. Für das experimentelle Vorgehen war jedoch darauf zu achten, dass nach der notwendigen basischen Inkubation im Argonstrom keine weitere Verzögerung eintrat, da das Enzym dadurch an Aktivität verliert.



#### 4.2.3. Gelelektrophorese zur Bestimmung der molaren Masse und Reinheit des Enzyms

Für die vorgestellten Untersuchungen wurde ein kommerziell erhältliches Lyophilisat der sauren Phosphatase verwendet. Vom Hersteller wird für das Enzym ein Molekulargewicht von 69 kDa angegeben. [Sigma-Aldrich, 2012] Leider handelt es sich bei dieser Angabe um eine reine Literaturangabe [Kruzel und Morawiecka, 1982] und nicht um eine durch den Hersteller analytisch ermittelte Masse. Durch eine gelelektrophoretische Auftrennung des Lyophilisates erfolgten daher eine Identifizierung der Phosphatase aufgrund ihrer molekularen Masse sowie eine Überprüfung der Reinheit des Lyophilisates. Details der Durchführung sind in Abschnitt 6.5.3 im Anhang beschrieben.



**Abbildung 43.** Gelelektrophorese der sauren Phosphatase aus der Kartoffel (Spuren von links nach rechts: 4 µg saure Phosphatase; See Blue®-Standard; Novex® Sharp-Standard; 6 µg saure Phosphatase)

In Abbildung 43 ist das Ergebnis der durchgeführten elektrophoretischen Analyse dargestellt. In der Literatur werden für die saure Phosphatase aus der Kartoffel unterschiedliche Molmassen diskutiert. Bereits 1975 wurden Abhängigkeiten der molekularen Masse des Enzyms von Lagerung und Alter der Kartoffel veröffentlicht. [Lucas und Pitt, 1975]

Darüber hinaus wurde von Gellatly *et al.* berichtet, dass neben dem nativen Enzym mit einer molaren Masse von 100 kDa [Gellatly *et al.*, 1994] eine weitere Doppelbande bei 55 und 57 kDa existiert, die von Untereinheiten des Enzyms stammt. Tanemura *et al.* fanden hingegen die saure Phosphatase als Homodimer aus zwei 33,5 kDa großen Einheiten vorliegend. [Tanemura und Yoshino, 2006]

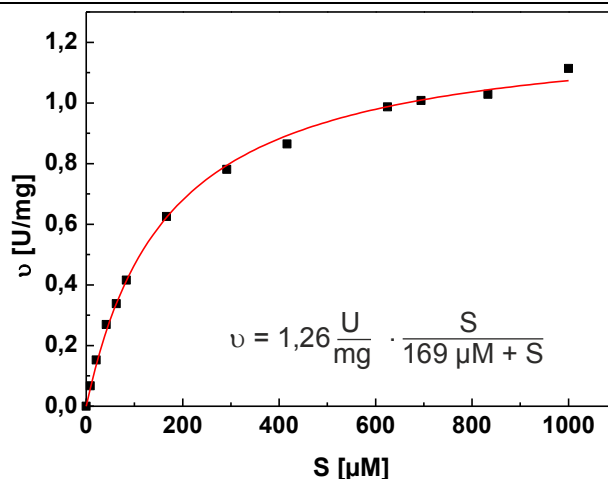
Die verwendete saure Phosphatase wurde in 2 verschiedenen Konzentrationen untersucht, welche in Spur 1 und 4 abgebildet sind. In der Mitte, d. h. in Spur 2 und 3, wurden zur graphischen Auswertung zwei kommerzielle Standards verschiedener Molmassen verwendet. Für die Phosphatase konnten drei Banden ermittelt werden. Bei 98 kDa zeigt sich die Bande des nativen Enzyms. Diese ist trotz Denaturierung des Enzyms in der Probenaufarbeitung in Spuren erkennbar. Des Weiteren findet man zwei weitere Banden bei 50,8 und 45,1 kDa, die den Untereinheiten des Enzyms zuzuordnen sind. Neben den Banden der sauren Phosphatase wurden weitere Banden, die nicht dem Enzym zugeordnet werden können, ermittelt. Zusätzlich zu den Multi-Proteinstandards wurden auch einzelne Proteine (hier nicht dargestellt) analysiert, um eine mögliche Übereinstimmung zu finden. Eine Zuordnung konnte jedoch getroffen werden. Der Ursprung der Verunreinigungen kann, ohne weitere Kenntnisse über den Herstellungsprozess des Enzyms, hier nicht geklärt werden. Die Kenntnis der Existenz von Verunreinigungen führt dazu, dass alle Angaben über die Aktivität des Enzyms spezifisch lediglich auf die Menge an eingewogenem Lyophilisat zurückgerechnet werden können. Da Nebenaktivitäten der Verunreinigungen nicht ausnahmslos ausgeschlossen werden können, ist die Angabe U/mg innerhalb dieser Arbeit gleichzusetzen mit U/mg<sub>Lyophilisat</sub>.

#### **4.2.4. Kinetische Untersuchungen der enzymatischen Reaktion**

Während die Hydrolyse des 2-Carboxyphenylphosphates eine bereits gut untersuchte Reaktion darstellt, handelt es sich bei der enzymatischen Umsetzung von CF-MUP um eine Reaktion, für die noch keine kinetischen Daten bekannt waren. Um diese Lücke zu schließen und die eigenen Messungen besser bewerten zu können, wurden kinetische Untersuchungen zur Hydrolyse des CF-MUP durchgeführt. Dafür wurde die Substratkonzentration zwischen 8,3 und 1000  $\mu\text{M}$  variiert und die resultierende Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gemessen. Das Reaktionsverhalten entspricht dabei einer klassischen Michaelis-Menten Kinetik mit einer Michaelis-Menten Konstante von 169  $\mu\text{M}$  und einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\text{Max}}$  von 1,26 U/mg (Abbildung 44).

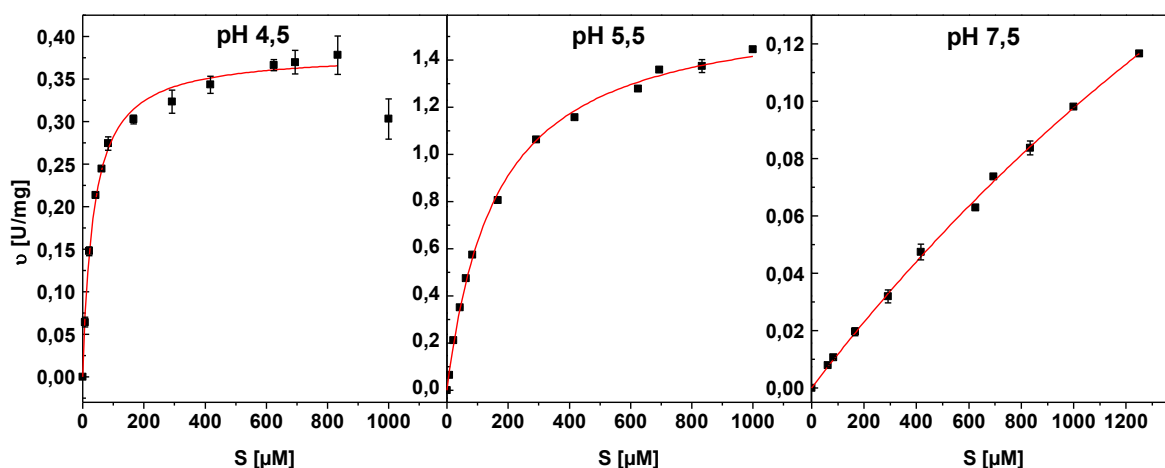
Die Michaelis-Menten-Konstante konnte in einer späteren Wiederholung der Messung mit guter Übereinstimmung reproduziert werden (vgl. Abbildung 44 vs. Tabelle 9, pH 5,5).

Die dabei ermittelten Werte für  $V_{Max}$  variieren geringfügig, liegen jedoch mit 1,26 U/mg und 1,64 U/mg in der gleichen Größenordnung. Die Abweichungen könnten dabei von Inhomogenitäten der verwendeten Lyophilisate stammen, die sich in abweichenden Enzymkonzentrationen widerspiegeln.



**Abbildung 44.** Michaelis-Menten Kinetik der sauren Phosphatase aus der Kartoffel für die Hydrolyse von CF-MUP (Inkubation:  $T = 25\text{ °C}$ ; Assay: Hydrolyse von CF-MUP; 0,04 mg/mL Phosphatase;  $T = 25\text{ °C}$ , Acetatpuffer pH 5,5; 8,3–1000  $\mu\text{M}$  CF-MUP)

Bei Änderung des pH-Wertes ändert sich die Kinetik der Hydrolysereaktion stark. Der Einfluss des pH-Wertes ist dabei in Abhängigkeit des eingesetzten Substrates unterschiedlich, wie bereits in der Literatur bekannt ist. [Alvarez, 1962]



**Abbildung 45.** Michaelis-Menten Kinetik der sauren Phosphatase aus der Kartoffel für die Hydrolyse von CF-MUP in Abhängigkeit des pH-Wertes (Inkubation:  $T = 25\text{ °C}$ ; Assay: Hydrolyse von CF-MUP; 0,04 mg/mL Phosphatase;  $T = 25\text{ °C}$ ; Acetatpuffer pH 4,0–5,5; TRIS-Maleat-Puffer pH 7,5; 8,3–1250  $\mu\text{M}$  CF-MUP)

Die Graphen in Abbildung 45 sowie die Daten in Tabelle 9 veranschaulichen die kinetischen Daten bei drei verschiedenen pH-Werten für die Hydrolyse des CF-MUP.

Bei sehr hohen Substratkonzentrationen, d. h. unter Sättigungsbedingungen, wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{Max}$  der enzymatischen Reaktion erreicht. [Horton H. R. *et al.*, 2008] Diese Umsatzrate folgt, wie erwartet, dem pH-Profil des Enzyms. Während die Phosphatase bei pH 5,5 eine Maximalgeschwindigkeit von 1,6 U/mg besitzt, sinkt diese im stärker sauren Bereich bei pH 4 bis auf 0,38 U/mg ab. Geht man in den leicht basischen Bereich, so verringert sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit um Faktor 3 auf 0,52 U/mg im Vergleich zum Aktivitätsmaximum.

Interessant ist der beobachtete Einfluss auf die Michaelis-Menten Konstante  $K_M$ . Diese kann als Maß für die Stärke der Substratbindung interpretiert werden, wobei eine steigende Michaelis-Menten Konstante auf eine sinkende Substrataffinität hindeutet. [Horton H. R. *et al.*, 2008]

Verschiedene pH-abhängige Faktoren können sowohl die Substratbindung als auch -umsetzung beeinflussen. Zum einen hat der Protonierungs-/Deprotonierungsgrad des aktiven Zentrums einen Einfluss auf den Eintritt und die Anbindung des Substrates. Der Mechanismus basiert, wie in Abschnitt 2.1.2 bereits beschrieben, auf zwei Metallzentren im aktiven Zentrum. [Schenk *et al.*, 2008] Die im Katalysezyklus entstehenden Intermediate (B) bis (F) der Abbildung 7 werden dabei von Histidinresten stabilisiert. [Olczak *et al.*, 2003] So ist es denkbar, dass der Protonierungsgrad der Histidin-Stickstoffatome verantwortlich für die sinkende Substratbindung mit zunehmendem pH-Wert ist: Mit steigendem pH-Wert, sinkt der Anteil der Protonierung am Imidazolium-Rest und somit auch die Fähigkeit der Intermediat-Stabilisierung über Wasserstoffbrückenbindungen. Dies könnte in der Konsequenz zu einer verminderten Substratbindung führen und steht damit in Übereinstimmung zu den Messwerten. Dennoch ist der Anstieg, der für den  $K_M$ -Wert verzeichnet wird, ungewöhnlich hoch. Neben der Stabilisierung von Intermediaten kann auch der Protonierungsgrad des eintretenden Phosphatesters eine wesentliche Rolle bei der Substratanbindung einnehmen. Für saure Histidin-Phosphatasen verschiedenen Ursprungs ist bekannt, dass eine Umsetzung des Substrates, nur bei Bindung des Monoanions des Phosphatesters erfolgreich ist. [Hickey *et al.*, 1976; Gundlach und Luttermannsemmer, 1987] Dementsprechend wird bei zunehmendem Vorliegen des Dianions eine scheinbar langsamere Substratsättigung beobachtet. Dies wurde für „purple acid“ Phosphatasen bislang nicht bestätigt. Überträgt man jedoch dieses Phänomen auf den vorliegenden Fall, so ergibt sich folgendes Bild: Bei einem pH-Wert von 4,0 liegen etwa 89 % des Substrates als Monoanion vor, während dieser Wert bei pH 5,5 bereits auf 20 % und auf 0,25 % bei pH 7,5 sinkt. Damit kann  $K_M$  hier als scheinbare Michaelis-Menten-Konstante  $K_{M,app}$  gesehen werden. In den kinetischen Untersuchungen ergibt sich bei einer Erhöhung des pH-Wertes aus dem sauren Bereich um 1,5 pH-Einheiten auf 5,5 eine Erhöhung dieser scheinbaren Michaelis-Menten Konstante um Faktor 5. Noch signifikanter ist jedoch der Unterschied durch den Wechsel in den neutralen bis schwach basischen Bereich.

Hier kommt es zu einem weiteren Anstieg von  $K_{M,app}$  um mehr als das 25-fache. In der Konsequenz bedeutet das, wenn man sich vom pH-Optimum hin zu sauren pH-Werten bewegt, kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Substratbindungsstärke bei gleichzeitiger Senkung der Umsetzung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES-Komplex). Verlässt man dagegen das pH-Optimum in Richtung basischer pH-Werte, so verringert sich die Substratbindungsstärke dramatisch bei gleichzeitiger Herabsetzung der ES-Komplexumsetzung.

**Tabelle 9.** Kinetische Parameter der Hydrolyse von CF-MUP bei variierendem pH-Wert

pH	[-]	4,0	5,5	7,5
$V_{Max}$	[U/mg]	0,38	1,64	0,52
$K_{M,app}$	[ $\mu$ M]	35,0	161,1	4284
$C_{Monoanion}$	[%]	88,8	20,1	0,25
$K_{M,korr}$	[ $\mu$ M]	30,6	33,0	10,5

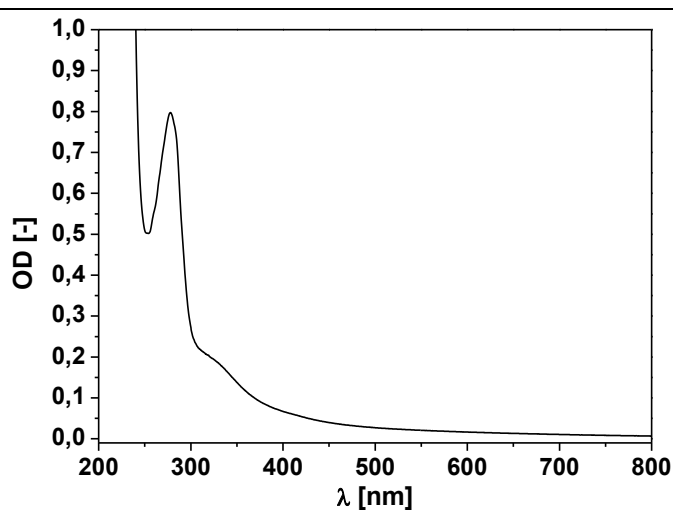
Korrigiert man die Konzentration des Phosphatesters auf die Konzentration des vorliegenden Monoanions, so kommt man zu  $K_{M,korr}$  (Tabelle 9). Die korrigierte Michaelis-Menten-Konstante liegt für alle drei pH-Werte in der gleichen Größenordnung und folgt, wie auch  $V_{Max}$ , dem pH-Profil des Enzyms. Daher kann vermutet werden, dass auch für die saure Phosphatase aus der Kartoffel eine Umsetzung des Monoanions des Substrates im Mechanismus bevorzugt wird.

Für eine Bestätigung dieser Aussage könnten in zukünftigen Untersuchungen sogenannte Docking-Studien herangezogen werden. Diese computergestützte Methode wurde ursprünglich für die Wirkstoffforschung der Pharmaindustrie entwickelt und kann in modifizierter Form auch für die Modellierung von Substrataffinitäten angewendet werden. [Gohlke und Klebe, 2002; Juhl und Pleiss, 2009] In diesen Studien könnten die Bindungsaffinitäten der unterschiedlichen Protonierungszustände des Substrates im aktiven Zentrum des Enzyms berechnet werden.

#### **4.2.5. Einfluss der Laserstrahlung auf die enzymatische Aktivität**

Besonders im kurzwelligen UV-Bereich kann Strahlung auf die enzymatische Aktivität einen starken Einfluss haben. Daher wird an dieser Stelle der Einfluss der beiden bislang verwendeten Anregungswellenlängen auf die Enzymaktivität betrachtet. Um eine erste Abschätzung über den Einfluss treffen zu können, wird zunächst das UV/Vis-Absorptionsspektrum der sauren Phosphatase betrachtet, da nur durch Absorption der Strahlung eine Wechselwirkung stattfinden kann.

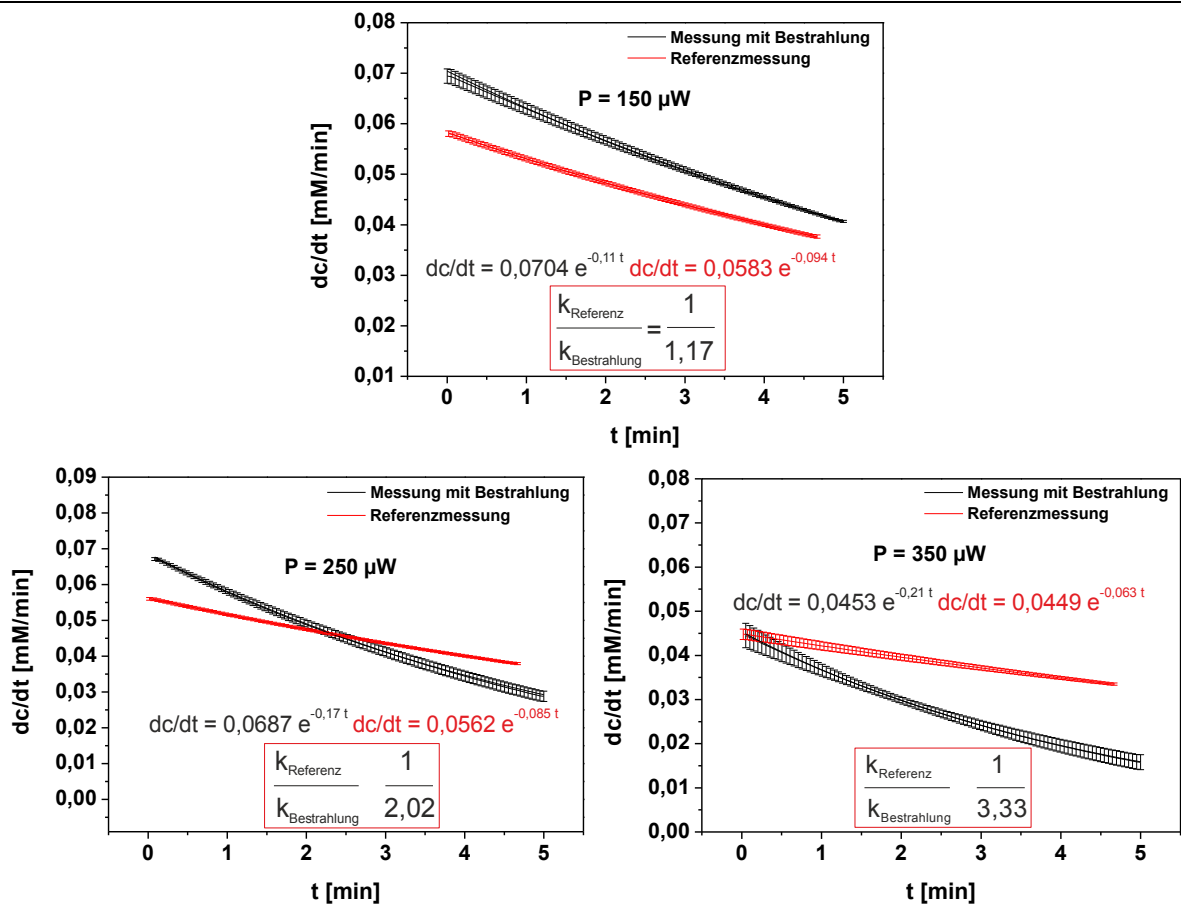
In Abbildung 46 ist das Absorptionsspektrum des Enzyms bei einer Konzentration von 1 mg/mL dargestellt. Man erkennt deutlich die Absorptionsbande der aromatischen Aminosäuren, wie Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin bei rund 280 nm mit  $\epsilon_{278\text{nm}} = 1,25 \text{ mL}/(\text{mg}\cdot\text{cm})$  (Abbildung 46). [Horton H. R. *et al.*, 2008] Zusätzlich findet man noch eine kleinere Absorptionsbande als Schulter bei 325 bis 330 nm. Hier konnte keine eindeutige Zuordnung gemacht werden. Die Absorptionsbande muss nicht zwangsläufig der Phosphatase, sondern kann auch einer anderen im Lyophilisat enthaltenen Komponente entstammen. Zusammenfassend bedeutet das, dass ein Einfluss von Strahlung bei 250 bis 300 nm zu erwarten ist, jedoch auch im Bereich zwischen 300 und 400 nm nicht ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 46.** Absorptionsspektrum der sauren Phosphatase aus der Kartoffel ( $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 1 mg/mL in Wasser)

Abschnitt 3.4.1 beschreibt den Aufbau, mit dem die Stabilität des Enzyms unter Reaktionsbedingungen getestet wurde. Dazu wurde mittels Fluoreszenzmessungen die enzymatische Umsetzung des 2-Carboxyphenylphosphates zu Salicylsäure während der Bestrahlung verfolgt. Es erfolgten jeweils zwei Messungen, die vergleichend den Einfluss der Laserstrahlung zeigen. Die Referenzmessung ohne Bestrahlung wurde durch UV-Absorptionsverfolgung durchgeführt, während die Bestrahlungsmessung im Laseraufbau unter Beobachtung der Fluoreszenz der Salicylsäure stattfand. Die Wellenlänge von 265 nm könnte demnach nicht nur zur späteren Anregung eines pH-Sprunges sondern auch zur Anregung der Fluoreszenz von Salicylsäure und damit zur Detektion der enzymatischen Reaktion während der Bestrahlung dienen. In Abbildung 47 ist der zeitliche Verlauf der enzymatischen Reaktion bei variierendem Einsatz der Laserleistung dargestellt. Wie erwartet, zeigt sich ein deaktivierender Einfluss der UV-Strahlung auf die Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Referenzmessung ist über die Reaktionszeit von 5 Minuten nicht konstant, wobei sich die Deaktivierungskonstante  $k_{\text{Referenz}}$  zwischen  $0,06$  und  $0,09 \text{ min}^{-1}$  bewegt.

Vergleicht man jedoch die Reaktionsgeschwindigkeiten der Referenzmessung mit denen die unter Bestrahlung erreicht werden, so zeigen sich je nach verwendeter Laserleistung zum Teil deutlich höhere Deaktivierungsraten. Unter Bestrahlung mit einer Laserleistung von 150  $\mu\text{W}$  ist der Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit nur geringfügig, während dieser bei Verwendung von 350  $\mu\text{W}$  bereits dreimal so hoch ist. Dabei zeichnet sich eine direkte Proportionalität der relativen Deaktivierungsraten zur verwendeten Laserleistung ab. Die Deaktivierung lässt sich mit der photochemischen Zersetzung der aromatischen Aminosäuren begründen. Sowohl für Tryptophan, Tyrosin [Feitelson J. *et al.*, 1973] als auch für Phenylalanin [Mittal *et al.*, 1973] ist eine photochemische Zersetzung bekannt. Durch den Abbau dieser Aminosäuren kann die Aktivität des Enzyms beeinflusst werden. Noch entscheidender für die Aktivität der sauren Phosphatase könnte an dieser Stelle jedoch die photochemische Umwandlung des Histidins [Nakano *et al.*, 2007] sein, das im aktiven Zentrum der sauren Phosphatase einerseits zur Stabilisierung der Intermediate, als auch der Anbindung der Metallzentren dient. [Olczak *et al.*, 2003; Schenk *et al.*, 2008]

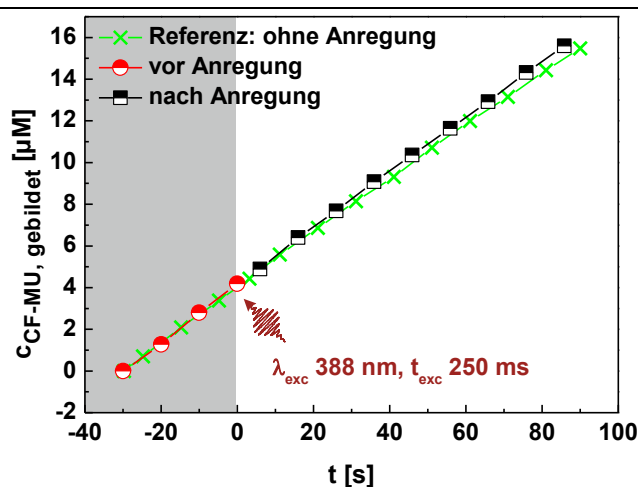


**Abbildung 47.** Einfluss von Laserstrahlung bei einer Anregungswellenlänge von 265 nm auf die Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase bei verschiedenen Laserleistungen (Inkubation:  $T = 21^\circ\text{C}$ ; Assay: Hydrolyse von 2-Carboxy-phenylphosphat;  $T = 21^\circ\text{C}$ ; 0,04 mg/mL Phosphatase; 150 mM Acetatpuffer pH 5,5; Detektion Referenzmessung: Absorptionsmessung bei 300 nm; Bestrahlung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 265$  nm; Detektion Bestrahlungsmessung: Fluoreszenzmessung bei 415 nm)

Darüber hinaus wurde auch die Abhängigkeit der Aktivierungsraten zur Enzymkonzentration untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch kein erkennbarer Zusammenhang (ohne Abbildung).

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Phosphatase bei Anregung im kurzwelligen UV-Bereich einem deaktivierenden Einfluss unterliegt. Zwar erfolgt die Anregung nicht kontinuierlich sondern sprunghaft, jedoch kann auch der kurzweilige Einsatz der Strahlung bei noch höheren Laserleistungen zu stark deaktivierenden Einflüssen führen.

Dadurch wird eine Aktivierung des Enzyms durch den pH-Sprung erschwert. Es ist daher aus Sicht der enzymatischen Reaktion vorteilhafter die Anregung im langwelligen UV-Bereich durchzuführen.



**Abbildung 48.** Einfluss von Laserstrahlung bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm auf die Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase (Inkubation:  $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Assay: Hydrolyse von CF-MUP; 0,04 mg/mL Phosphatase;  $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 150 mM Acetatpuffer pH 5,5; Detektion Absorptionsmessung bei 370 nm; Bestrahlung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 388\text{ nm}$  für 250 ms)

Da auch bei 390 nm noch eine geringfügige Absorption durch das Enzym vorhanden ist, wurde auch in diesem Bereich die Stabilität der enzymatischen Aktivität unter Einfluss der gepulsten Laserstrahlung untersucht. Anders als bei den vorhergehenden Untersuchungen, wurde in diesem Fall die Probe der Strahlung nicht kontinuierlich über den gesamten Verfolgungszeitraum ausgesetzt, sondern wie in den Experimenten vorgesehen über einen kurzen Zeitraum bei hohen Leistungen. Dazu wurde die CF-MUP-Hydrolyse unter folgenden Bedingungen verglichen: die enzymatische Reaktion (Abbildung 48)

- i. ohne Bestrahlung,
- ii. vor der Bestrahlung,
- iii. nach der Bestrahlung.

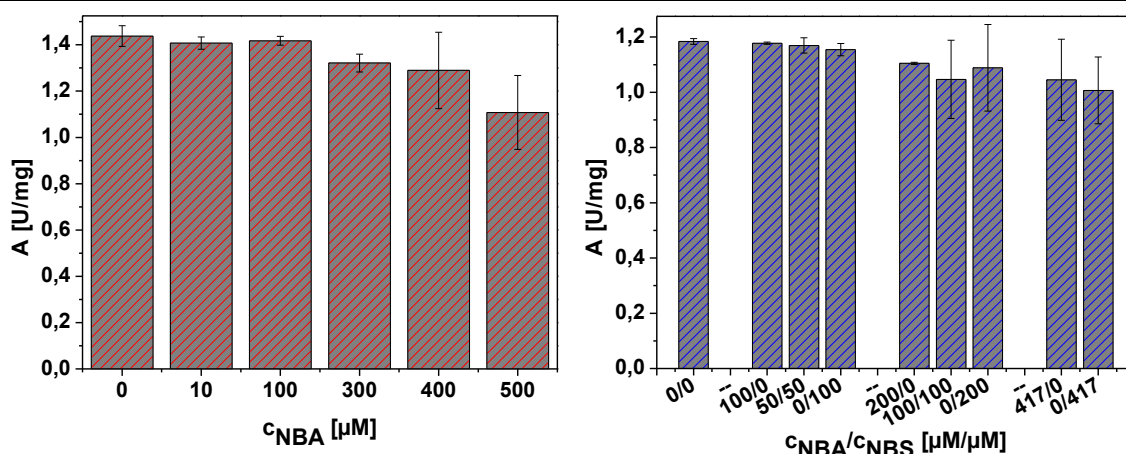
Die Messungen zeigen deutlich, dass der pH-Sprung laserinduziert unter diesen Bedingungen ohne den geringsten Verlust an Aktivität durchgeführt werden kann. Für die Messungen ohne Bestrahlung wurde eine Aktivität von 0,19 U/mg beobachtet. Dieser Wert liegt, für die verwendete Substratkonzentration, in den Fehlergrenzen der Michaelis-Menten Kinetik.



Auch nach der Anregung für 250 ms bei 388 nm behält das Enzym seine ursprüngliche Aktivität von 0,2 U/mg fast vollständig bei. Es besitzt noch eine Aktivität von 0,19 U/mg. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass durch die Anregungsstrahlung keine deaktivierenden Einflüsse auf das Enzym einwirken, da in allen Messungen vergleichbare Aktivitäten erzielt wurden. Das bedeutet dass die Anregungsstrahlung gegenüber dem Enzym, in der für die pH-Sprungexperimente benötigten Anregungswellenlänge und –zeit, eine hohe Kompatibilität aufweist.

#### 4.2.6. Einfluss des 2-Nitrobenzaldehydes auf die enzymatische Aktivität

Die Aktivität von Enzymen wird von vielen Faktoren beeinflusst, so auch durch den Zusatz weiterer chemischer Komponenten. Für die Durchführung der pH-Sprungexperimente ist es daher von Bedeutung, dass die ausgewählte photoaktivierbare Verbindung die Aktivität der Phosphatase nicht signifikant verringert. Um dies auszuschließen, wurde die Aktivität der sauren Phosphatase in Abhängigkeit der Konzentration an 2-Nitrobenzaldehyd untersucht. Auch der Einfluss der, durch die Photolyse gebildeten, 2-Nitrosobenzoessäure ist dabei zu berücksichtigen. In Abbildung 49 wird die Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration an 2-Nitrobenzaldehyd gezeigt, sowie der Zusammenhang zwischen der Aktivität und der chemischen Umsetzung zur 2-Nitrosobenzoessäure.



**Abbildung 49.** Einfluss des 2-Nitrobenzaldehydes (links) und verschiedene Verhältnisse von 2-NBA/2-NBS (rechts) auf die enzymatische Aktivität (Inkubation:  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Assay: Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat;  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 0,02 mg/mL Phosphatase; Lösungsmittel Acetatpuffer pH 5,5)

Geringe Konzentrationen an 2-Nitrobenzaldehyd, bis zu 100 µM, zeigen keinen Einfluss auf die hydrolytische Aktivität des Enzyms. Auch der Austausch von 2-Nitrobenzaldehyd durch 2-Nitrosobenzoessäure führt im untersuchten Bereich nur zu einer geringfügigen Desaktivierung um 2 %.

Mit steigender Konzentration an 2-Nitrobenzaldehyd bzw. 2-Nitrosobenzoessäure sinkt die Enzymaktivität weiter. So hat die Phosphatase bei Anwesenheit von ca. 400  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehyd noch eine Restaktivität von 88 % und in Gegenwart derselben Menge an 2-Nitrosobenzoessäure noch 85 % Aktivität. Von Na,K-ATPasen ist bekannt, dass photochemisch freigesetzte Nitrosogruppen als Inhibitoren wirken. [Kaplan *et al.*, 1978; Barth *et al.*, 1997] Dabei wird vermutet, dass die Nitroso-Funktionalität mit Thiol-Gruppen des Cysteins in den Enzymmolekülen reagiert und auf diesem Weg die enzymatische Reaktion hemmt. Auch bei der Untersuchung alkalischer Phosphatasen in Gegenwart von 2-Nitrosoacetophenon wurden Veränderungen im Rückgrat des Enzyms ermittelt, die auf die Reaktion der Nitrosogruppe zurückgeführt werden. [Zhang *et al.*, 2004]

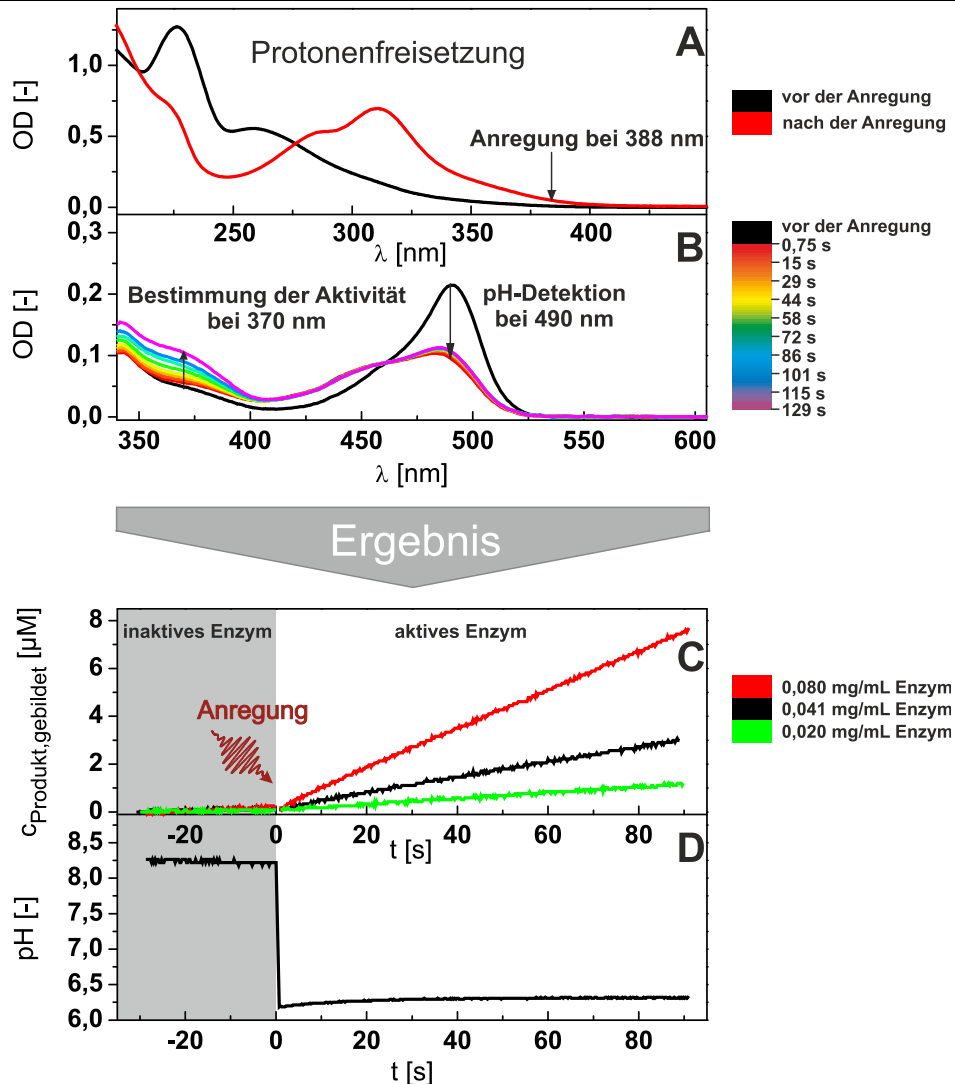
Es lässt sich schlussfolgern, dass ein deaktivierender Einfluss der photoaktivierbaren Verbindung und ihrem Photoprodukt besteht, dieser aber im Rahmen dieser Messungen akzeptabel ist. Zwar lässt sich ein stark deaktivierbarer Effekt des Triggersubstrates bei sehr hohen Konzentrationen nicht ausschließen, die verwendeten Konzentrationen des Aldehydes bis zu 500  $\mu\text{M}$  führen jedoch lediglich zu einem leichten Rückgang der Aktivität, um maximal 23 % (vgl. Abbildung 49, links). Das bedeutet, dass die Phosphatase trotz der Anwesenheit des 2-Nitrobenzaldehydes eine ausreichend große Aktivität zeigt. Darüber hinaus zeigt sich ein geringer, aber tolerierbarer Einfluss durch die Umlagerung des Aldehydes zur Nitrosobenzoessäure.

#### **4.2.7. Untersuchung der laserinduzierten Enzymaktivierung**

Sowohl für die pH-Sprunggenerierung als auch für die Erhaltung eines aktiven Enzyms erwies sich in den Untersuchungen die Anwendung von 388 nm als geeignete Anregungswellenlänge. Der Einsatz von 2-Nitrobenzaldehyd und dessen photolytische Umsetzung zeigten sich bezüglich der Enzymaktivität bis zu einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  unproblematisch. Darüber hinaus führt die Verwendung dieser Konzentration auch zu einem ausreichend großen pH-Sprung. Nach der erfolgreichen Charakterisierung der einzelnen Komponenten des Aktivierungssystems, wird nun nachfolgend die Aktivierung der enzymatischen Funktion durch den laserinduzierten pH-Sprung untersucht. Der laserinduzierte pH-Sprung führt als Ergebnis des pH-Profiles der sauren Phosphatase zu einer optischen Schaltung der Enzymaktivität. [Kohse *et al.*, 2013] Dieses komplexe System der photolytischen Umsetzung und der resultierenden Enzymaktivierung ist graphisch in Abbildung 50 zusammengefasst (detaillierte Spektren sind im Anhang in Abbildung 67 und Abbildung 68).

In Abbildung 50-A ist die Umsetzung der photoaktivierbaren Substanz 2-Nitrobenzaldehyd dargestellt. Für einen besseren Überblick ist die Anregungswellenlänge eingezeichnet. Simultan zur Detektion des pH-Sprungs bei 490 nm wird der Beginn der enzymatischen Reaktion verfolgt (Abbildung 50-B).

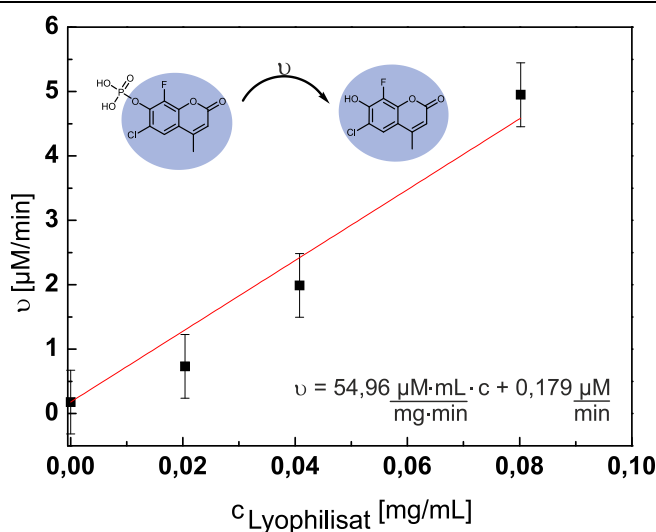
Dabei erfolgt die Detektion leicht rotverschoben zum Absorptionsmaximum des entstehenden Produktes um Interferenzen mit den zusätzlich auftretenden Absorptionsänderungen der Photolyse zu minimieren. Abbildung 50-C und D belegen die externe lichtinduzierte Kontrolle der Enzymaktivität. Hier wird die zeitliche Verfolgung des pH-Sprungs der einsetzenden Produktbildung gegenübergestellt.



**Abbildung 50.** A: Absorptionsspektren einer wässrigen 100 µM 2-Nitrobenzaldehyd-Lösung vor und nach der Anregung ( $\lambda_{exc} = 270$  nm;  $P_{Laser} = 0,23$  mW;  $t_{exc} = 300$  s) B: zeitliche Verfolgung der Absorptionsspektren des pH-Sprungsystems ( $\lambda_{exc} = 388$  nm;  $P_{Laser} = 160$  mW;  $t_{exc} = 250$  ms; 500 µM 2-NBA; 3 µM Fluorescein; 83,3 µM CF-MUP und 0,08 mg/mL saure Phosphatase) (die Absorption von 2-NBA vor und nach der Anregung wurde mathematisch eliminiert) C: aus der optischen Anregung resultierende Aktivierung der hydrolytischen Umsetzung von CF-MUP durch die saure Phosphatase bei verschiedenen Enzymkonzentrationen (Bedingungen wie unter B) (rot 0,08 mg/mL; schwarz 0,041 mg/mL; grün 0,02 mg/mL saure Phosphatase in 150 mM NaCl) D: aus der Anregung resultierender pH-Sprung (Bedingungen wie unter B) [Kohse *et al.*, 2013]

Vor der Anregung ist keine signifikante hydrolytische Aktivität erkennbar. Durch die Anregung bei 388 nm für 250 ms wird ein pH-Sprung bis auf einen pH von 6,25 generiert. Dies führt, wie Abbildung 50-C zeigt, zum Beginn der hydrolytischen Umsetzung.

Nach der Aktivierung des Enzyms konnte eine Reaktionsgeschwindigkeit von  $0,06 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{Enzym}})$  bei einem Einsatz von  $0,08 \text{ mg/mL}$  saurer Phosphatase beobachtet werden. Das entspricht einer achtfachen Aktivierungsrate der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Reaktionsrate vor dem laserinduzierten pH-Sprung. In Referenzexperimenten wurde bestätigt, dass der detektierte Anstieg allein auf die hydrolytische Aktivität zurückzuführen ist. Dafür wurden Proben untersucht, die lediglich das Substrat CF-MUP oder die saure Phosphatase im System enthielten. Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg der verfolgten Absorption.



**Abbildung 51.** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der aktivierten Enzymreaktion von der Konzentration des eingesetzten Enzyms ( $\lambda_{\text{exc}} = 388 \text{ nm}$ ;  $P_{\text{Laser}} = 160 \text{ mW}$ ;  $t_{\text{exc}} = 250 \text{ ms}$ ;  $500 \mu\text{M}$  2-NBA;  $3 \mu\text{M}$  Fluorescein;  $83,3 \mu\text{M}$  CF-MUP und  $0,041 \text{ mg/mL}$  saure Phosphatase) [Kohse *et al.*, 2013]

Zusätzlich wurde auch die Aktivierung für unterschiedliche Enzymkonzentrationen von  $0,02$  bis  $0,04 \text{ mg/mL}$  untersucht. Wie erwartet, sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit nach der Anregung mit abnehmender Enzymkonzentration. Bei genauer Betrachtung lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Reaktionsrate und der Enzymkonzentration erkennen (Abbildung 51). Aus dem resultierenden Anstieg ergibt sich eine mittlere Aktivität von  $0,055 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{Lyophilisat}})$ . Dies entspricht auch dem für  $0,08 \text{ mg/mL}$  Enzym ermittelten Einzelwert.

Um zu bestätigen, dass durch die laserinduzierte Aktivierung das Enzym zu  $100 \%$  reaktiviert wird, d. h. die maximal möglichen Reaktionsraten unter den gegebenen Bedingungen erreicht werden, wurden folgende Vergleichsexperimente durchgeführt: Die Aktivität der Phosphatase wurde in einem konventionellen Assay unter Zusatz des Phototriggers bei  $\text{pH } 6$  vermessen. Zusätzlich wurde die Umsetzung vor und nach der laserinduzierten Aktivierung ermittelt.

Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu ermitteln, wurden die Experimente mehrfach wiederholt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10.** Reaktionsraten der laserinduzierten pH-Sprung-Aktivierung im Vergleich zur konventionellen enzymatischen Umsetzung unter äquivalenten Bedingungen (83,3  $\mu\text{M}$  CF-MUP; 0,041 mg/mL saure Phosphatase in 150 mM NaCl; 500  $\mu\text{M}$  2-NBA; 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein) [Kohse *et al.*, 2013]

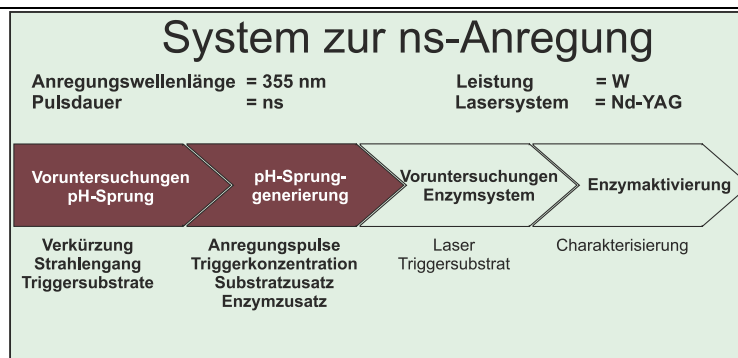
Legende	pH [-]	$v$ [ $\mu\text{M}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]	Anzahl der Messungen
Start-pH 8 vor dem laser-induzierten pH-Sprung	$8,07 \pm 0,02$	$0,014 \pm 0,01$	$n = 3$
End-pH 6 nach dem laser-induzierten pH-Sprung	$5,93 \pm 0,07$	$0,109 \pm 0,018$	$n = 3$
Start-pH 6 ohne laser-induzierten pH-Sprung	$6,06 \pm 0,01$	$0,101 \pm 0,009$	$n = 4$

Bei einem Start-pH-Wert von 8, vor der Anregung, beträgt die Enzymaktivität lediglich  $0,014 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{Lyophilisat}})$ . Die Anregung der Probe führt zu einer sprunghaften Senkung des pH-Wertes auf pH 6 und in der Konsequenz steigt die Enzymaktivität unmittelbar um das achtfache auf  $0,109 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{Lyophilisat}})$ . Die Aktivierungsrate um Faktor 8 ist konsistent mit den bereits vorgestellten Aktivierungsexperimenten. In einem äquivalenten Experiment wurde bei gleicher Probenzusammensetzung die Enzymaktivität bei pH 6 ohne Bestrahlung bestimmt. Dabei konnte eine Aktivität von  $0,101 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{Lyophilisat}})$  bestimmt werden.

Der Vergleich der Experimente zeigt deutlich, dass durch die laserinduzierte pH-Sprungmethode das Enzym zu 100 % aktiviert wird. Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass mit der vorgestellten Methode durch die externe, optische Steuerung des pH-Wertes die enzymatische Funktion der sauren Phosphatase aktiviert werden kann.

### 4.3. Demonstration der pH-Sprunggenerierung im Nano-sekunden-Bereich

Im Abschnitt 4.2 wurde gezeigt, dass die laserinduzierte pH-Sprungmethode erfolgreich für die optische Steuerung von Enzymaktivitäten im Zeitregime von Millisekunden eingesetzt werden kann. Da das Potenzial der photolytischen Protonenfreisetzung mit dem fs-Lasersystem aufgrund zu geringer Leistungen nicht ausgeschöpft werden konnte, wurden weitere Experimente unter Verwendung eines ns-Lasers mit deutlich erhöhter Leistung durchgeführt.

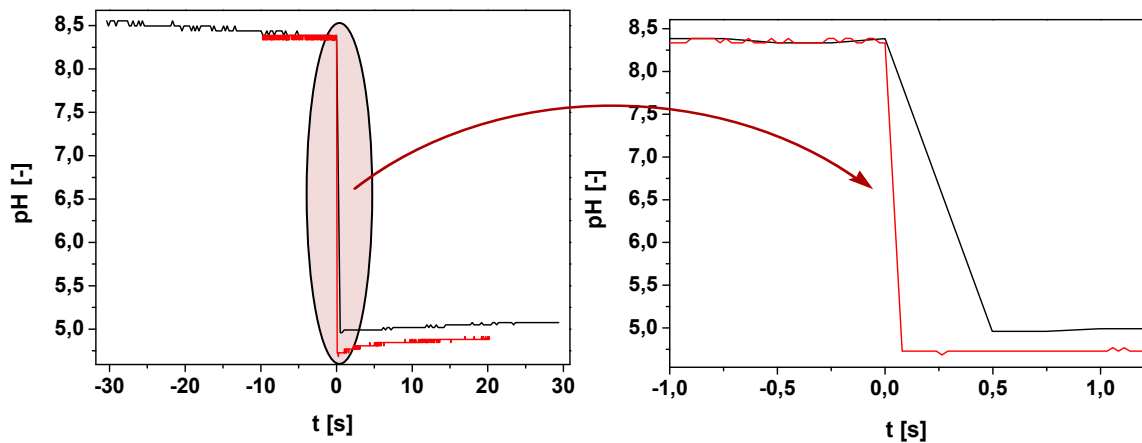


Die folgenden Experimente zielten insbesondere darauf ab, eine Verkürzung der Anregungszeit zu erreichen. Der dabei eingesetzte ns-Laser bietet zum einen den Vorteil, dass bei 355 nm, der dritten Harmonischen der Fundamentalen des verwendeten Nd-YAG-Lasers, mit ca. 2,4 W eine sehr intensive Leistung der Anregungswellenlänge zur Verfügung stand (Aufbau siehe Abschnitt 3.3.2). Zum anderen ist diese im Vergleich zu der Anregung bei 388 nm aus den vorher beschriebenen pH-Sprungexperimenten zusätzlich zur erhöhten Leistung etwas energiereicher. Aufgrund der Absorptionsspektren von 2-NBA wird damit bei der Anregungswellenlänge von 355 nm der Absorptionsquerschnitt der eingebrachten Strahlung deutlich erhöht.

#### 4.3.1. pH-Sprungverhalten bei Übergang der Anregungszeit in den Nanosekunden-Bereich

Das Ziel der vorliegenden Experimente ist es, eine Anregung im Bereich von Nanosekunden zu erreichen. Der limitierende Reaktionsschritt, die Dissoziation der entstehenden Nitrosobenzoessäure, findet im Bereich von Nanosekunden statt. [Donten und Hamm, 2011] Somit wäre das zeitliche Potenzial des 2-Nitrobenzaldehydes ausgeschöpft.

Um eine Vergleichbarkeit zu den früheren Experimenten herstellen zu können wurde die Anregung ebenfalls mit einer 500  $\mu$ M 2-Nitrobenzaldehydlösung durchgeführt. Abbildung 52 zeigt den pH-Sprung initiiert mit dem fs-Laser (schwarze Kurve) im Vergleich zur Initiierung mit dem ns-Laser (rote Kurve). Die Anregung mit dem fs-Laser erfolgte wie bereits erwähnt bei 388 nm für 250 ms, während die Anregung mit dem ns-Laser bei 355 nm mit 7 Pulsen und damit aufgrund der Repetitionsrate des Laser für 7 ms erfolgte. Die Zeit der Anregung wurde damit um Faktor 35 verkürzt. Dies korreliert auch mit der Leistungserhöhung um Faktor 31, wenn man neben der Leistung des Nd-YAG-Lasers mit 2,4 W (hier wurden vorhandene Verluste des Halbspiegels nicht berücksichtigt) eine Leistung von 80 mW (es wird ca. die Hälfte des eingestrahnten Lichts von 160 mW für die Bestrahlung verwendet) für den Ti-Saphir-Laser zugrunde legt.

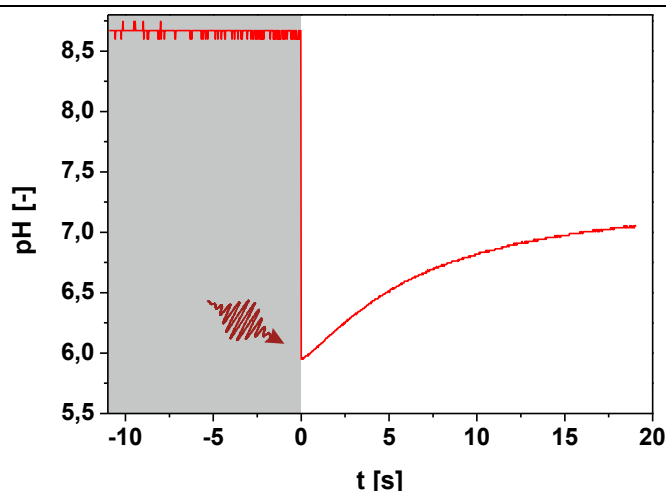


**Abbildung 52.** pH-Sprung einer 500  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehyd-Lösung im Vergleich beider experimenteller Anordnungen (schwarz:  $\lambda_{\text{exc}} = 388 \text{ nm}$ ;  $P = 160 \text{ mW}$ ;  $t_{\text{exc}} = 250 \text{ ms}$ ; rot:  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ;  $t_{\text{exc}} = 7 \text{ ms}$ ; die Lösungen enthalten zusätzlich 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein)

Zudem ist eine weitere Erhöhung des pH-Sprunges zu verzeichnen. So ist ein pH-Sprung von 3,66 pH-Einheiten auf pH 4,73 erreichbar, was eine leichte Verbesserung um 0,2 pH-Einheiten bedeutet.

Die Anregungsdauer im ms-Bereich ist nun lediglich bedingt durch die Repetitionsrate der Pulse von 1 kHz. Folglich war noch eine Verbesserung von Faktor sieben nötig um eine Anregung im Nanosekundenbereich zu erreichen. An dieser Stelle kann auch ein Vergleich zur bestehenden Literatur vorgenommen werden. Wie bereits erwähnt sind pH-Sprungexperimente zur Untersuchung von Faltungsprozessen unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 355 nm bekannt. [Abbruzzetti *et al.*, 2004] In dieser Arbeit wird durch Einzelpulsanregung, in Abhängigkeit der angewendeten Laserpulsenergie, eine Hydroniumionenkonzentration von bis zu 1 mM erzeugt. Die dabei eingebrachte Energie von 120 mJ entspricht, umgerechnet für die hier angewendete Leistung, einer Anregungszeit von 50 ms bzw. 50 Pulsen. Bei einem Zehntel der eingebrachten Energie erreichten sie auch rund ein Zehntel der Protonenfreisetzung. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Messungen unter Ausnutzung der doppelten Wegstrecke (2 cm Schichtdicke) durchgeführt wurden. Unter Berücksichtigung all dieser Faktoren beträgt die erzeugte Hydroniumionenkonzentration bei einem, zu unserem experimentellen Aufbau, vergleichbaren Leistungseintrag rund 70  $\mu\text{M}$ . Damit sind in den hier vorgestellten Messungen rund 26 % der Hydroniumionenkonzentration experimentell erreicht worden (rund 18  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zu literaturbekannten Experimenten.

Um das Potenzial der Einzelpulsanregung im Nanosekunden-Bereich innerhalb dieses Aufbaus zu untersuchen, wurden pH-Sprungexperimente mit nur einem Puls durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 53 dargestellt.



**Abbildung 53.** pH-Sprung einer 500  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehyd-Lösung durch Einzelpulsanregung mit rund 6 ns ( $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ;  $t_{\text{exc}} = 6 \text{ ns}$ ; die Lösung enthält zusätzlich 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein)

Auch im Nanosekunden-Bereich ist ein pH-Sprung realisierbar, so sinkt der pH-Wert anfänglich um 2,7 pH-Einheiten bis auf pH 6 ab. Jedoch kommt es zu einem starken Anstieg des pH-Wertes nach dem eigentlichen pH-Sprung. Der pH-Wert steigt innerhalb von 20 Sekunden bis auf pH 7 an, wobei erkennbar ist, dass ein Gleichgewichtszustand noch nicht erreicht ist. Die Gründe für den Anstieg des pH-Wertes sind vermutlich auch hier wieder in einer Rückvermischung nicht- oder unzureichend bestrahlter Lösung zu sehen.

Bei Abschätzung des Potenzials des initialen pH-Sprungs in Bezug auf die Aktivierungsexperimente stellt man fest, dass der erreichbare pH-Wert im leicht sauren und damit aktiven pH-Bereich des Enzyms liegt. Jedoch wurde das Experiment in Abwesenheit von Enzym und Substrat durchgeführt. Das bedeutet, dass durch Zusatz der Komponenten des enzymatischen Systems der pH-Sprung um etwa eine pH-Einheit gesenkt würde und damit im Gesamtsystem ein pH-Wert von etwa sieben erreichbar wäre. Die Abschätzung der pH-Wert-Erhöhung erfolgte dabei über die vorangegangenen Messungen am fs-Laser.

#### 4.3.2. pH-Sprungverhalten weiterer verwendeter 2-Nitrobenzaldehydderivate

Das Ziel der Derivatisierung des 2-Nitrobenzaldehydes war es durch Erhöhung der Photolyserate und gleichzeitiger Anhebung der Neigung zur Deprotonierung eine Verbesserung des pH-Sprunges zu erreichen. Im ersten Teil des Abschnittes werden sowohl qualitativ, als auch quantitativ die optischen Eigenschaften der Komponenten dargestellt und die Verfolgung der photochemischen Umsetzung betrachtet. Im zweiten Abschnitt wird dann das pH-Sprungverhalten untersucht.



Für den Einsatz einer photoaktivierbaren Verbindung, des sog. Triggersubstrates, innerhalb der pH-Sprungexperimente existieren einige Kriterien, die dieser erfüllen sollte. So sollte die photoaktivierbare Verbindung [Pelliccioli und Wirz, 2002]

- i. in hoher Reinheit vorliegen,
- ii. hohe molare Absorptionskoeffizienten über 300 nm besitzen,
- iii. wie sein Photoprodukt ein Spektrum besitzen, das die Detektion der Enzymreaktion nicht stört,
- iv. eine effiziente photochemische Umsetzung erlauben, d.h. die photochemische Anregung sollte eine hohe Quantenausbeute haben,
- v. sich gut im gewünschten Lösungsmittel lösen.

Zudem sollte das Produkt der photolytischen Umsetzung einen geringen  $pK_s$ -Wert besitzen, so dass ein stabiler pH-Wert nach der Freisetzung der Protonen gewährleistet ist. Darüber hinaus ist es entscheidend, dass der Zusatz an photoaktivierbarer Substanz und ihrem Photoprodukt die Aktivität des Enzyms nicht signifikant senkt. Die vollständige Erfüllung all dieser Kriterien ist keine grundlegende Voraussetzung. Dennoch ist es vorteilhaft bei der Wahl der photoaktivierbaren Komponente diese zu berücksichtigen.

Neben dem 2-Nitrobenzaldehyd, das in den Experimenten bereits erfolgreich eingesetzt wurde, wurden zusätzlich substituierte Halogenderivate des 2-Nitrobenzaldehydes untersucht, um den Einfluss des Halogens auf die Absorptionseigenschaften und ihre Eignung als Protonendonator zu prüfen. In der Literatur war bislang nur bekannt, dass die Einführung eines Chlor-Substituenten zu einer leichten Senkung des  $pK_s$ -Wertes der intermediär auftretenden Aci-Nitro-Verbindung (siehe Abschnitt 2.2.2, Beschreibung des Mechanismus der Photolyse) führt. [Abbruzzetti *et al.*, 2003]

**Tabelle 11.** Übersicht über relevante Eigenschaften der untersuchten photoaktivierbaren Verbindungen

Substrat	Löslichkeit [ $\mu\text{M}$ ]	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	$\epsilon_{355\text{nm}}$ [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	$k_{\text{Photolyse}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$pK_s^c$ [-]
2-Nitrobenzaldehyd	$\geq 750$	226	0,373	$3,6 \cdot 10^{-4}^b$	2,51
4-Fluor-2-Nitrobenzaldehyd	$\geq 500^a$	227 <sup>a</sup>	0,372 <sup>a</sup>	$3,8 \cdot 10^{-4}^b$	2,26
4-Chlor-2-Nitrobenzaldehyd	300 <sup>a</sup>	234 <sup>a</sup>	0,292 <sup>a</sup>	$4,3 \cdot 10^{-4}^b$	2,31
4-Brom-2-Nitrobenzaldehyd	430 <sup>a</sup>	238 <sup>a</sup>	0,352 <sup>a</sup>	$5,1 \cdot 10^{-4}^b$	2,31

<sup>a</sup> [Höhne, 2012]; <sup>b</sup> Werte errechnet aus Daten von [Höhne, 2012]; <sup>c</sup> Säurekonstanten der korrespondierenden Photoprodukte

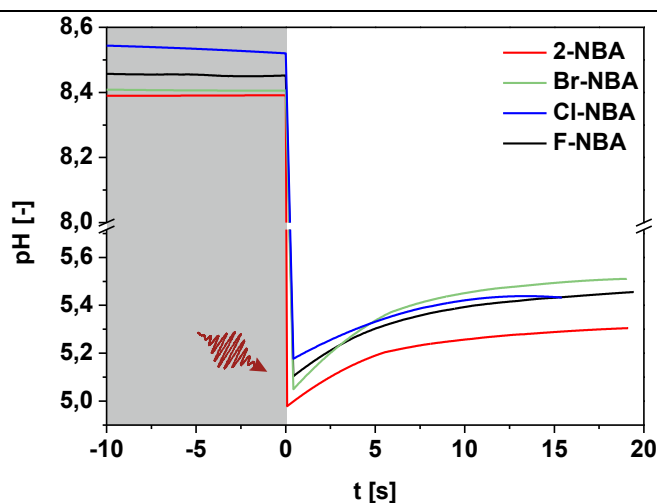
Die Deprotonierung der entstehenden Nitrosobenzoessäuren sowie die Auswirkungen der Derivatisierung auf die Löslichkeit oder Photolyse waren nicht bekannt. In Tabelle 11 werden die wichtigsten relevanten Eigenschaften der Triggersubstrate zusammengefasst.

Bei Betrachtung des UV-Vis-Spektrums des 2-Nitrobenzaldehydes (Anhang, Abbildung 66) zeigen sich zwei intensive Banden bei 226 nm und bei 257 nm. In beiden Banden zeigen sich Beiträge von  $\pi(\text{CC}) \rightarrow \pi^*(\text{CO})$ -Übergängen. [Leyva *et al.*, 2008] Die Absorption bei 226 nm kann zusätzlich einer Addition aus einem  $\pi\pi^*$ -Übergang lokalisiert in der  $\text{NO}_2$ -Funktionalität und einem Charge-Transfer-Übergang von der Aldehyd- zur Nitrogruppe zugeordnet werden. Die Absorptionsbande bei 257 nm hingegen kann darüber hinaus zwei  $\pi(\text{CC}) \rightarrow \pi^*(\text{NO}_2)$  Charge-Transfer-Prozessen zugewiesen werden. [Leyva *et al.*, 2008] Vergleicht man die Absorptionsmaxima bei 220 nm, weisen sie durch die Einführung der Halogensubstituenten eine geringe bathochrome Verschiebung auf (Vergleiche Tabelle 11). Halogene besitzen einen +M- und einen -I-Effekt und beeinflussen somit die Elektronendichte des Systems. So erhöht sich die Ladungsdichte am Kohlenstoff 4, dagegen kommt es an den Positionen 3 und 5 zu einer Erniedrigung. [Hesse M. *et al.*, 2005] Das bedeutet, dass sich auch in direkter Nachbarschaft zur C-N-Bindung die Ladungsdichte verringert. Auf diese Weise werden sowohl der  $\pi\pi^*$ -Übergang der  $\text{NO}_2$ -Gruppe, als auch die Charge-Transfer-Übergänge beeinflusst. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu höheren Wellenlängen, wie in der Literatur bereits für halogenierte Benzole bekannt, vom Fluor zum Brom an. [Hesse M. *et al.*, 2005]

Um den Grad der Deprotonierung der entstehenden Photoprodukte und damit die Menge freigesetzter Protonen im pH-Sprung-Experiment abzuschätzen, wurde der  $pK_s$ -Wert der korrespondierenden Nitrosobenzoessäuren bestimmt. Wie in Tabelle 11 dargestellt ist, führt die Einführung des Halogens zu einer leichten Senkung des  $pK_s$ -Wertes, wobei die Säurekonstante dann aber im Fehlerbereich der Bestimmung konstant ist. Die geringeren Säurekonstanten geben einen Hinweis darauf, dass bei gleicher Anregungszeit im pH-Sprungexperiment ein geringerer pH-Wert erreichbar oder durch eine geringere Anregungszeit der gewünschten pH-Sprung einstellbar sein könnte. Auch die Geschwindigkeitskonstante der photolytischen Umsetzung bei 366 nm weist die gleiche Tendenz auf. Die photochemische Umsetzung zeigt eine zunehmende Geschwindigkeit der Photolyse sowohl durch die Einführung des Substituenten als auch in der Reihe der Substituenten vom Fluor zum Brom auf. Beide Faktoren, das heißt die steigende Photolysegeschwindigkeit und die zunehmende Neigung zur Deprotonierung des Produktes deuten darauf hin, dass durch den Einsatz dieser Alternativsubstanzen eine geringfügige Verbesserung des pH-Sprungs möglich sein sollte. Einen gegenläufigen Trend zeigt jedoch die Betrachtung der Löslichkeit und der Extinktionskoeffizienten. Die Löslichkeit in wässriger Lösung wird durch die Einführung des Halogensubstituenten herabgesetzt. Das wirkt sich limitierend auf den Einsatz der maximalen Konzentration an Triggersubstrat aus. Auch die Extinktionskoeffizienten bei 355 nm nehmen durch die Halogenierung ab. Das bedeutet, dass bei gleicher angewendeter Laserleistung weniger Energie für die photochemische Umsetzung genutzt werden kann.

Im zweiten Teil dieses Abschnittes wird der Einsatz der halogenierten Nitrobenzaldehydderivate als Triggersubstrate für den laserinduzierten pH-Sprung vorgestellt. Dabei wird ein Vergleich zum bereits untersuchten 2-Nitrobenzaldehyd gezogen, mit dem Ziel eine Verbesserung des pH-Sprunges durch die Einführung eines Substituenten zu erreichen.

In Abbildung 54 wird gezeigt, dass alle untersuchten Derivate einen leichten Rückgang des erreichbaren pH-Niveaus zeigen. Betrachtet man den initialen pH-Wert nach dem Sprung, so sieht man, dass für das 4-Brom-2-Nitrobenzaldehyd ein pH-Wert von rund 5,0 erzielt wurde. Die fluoridierte bzw. chlorierte Verbindung weist anfänglich einen etwas geringfügigeren pH-Sprung auf pH 5,1 auf, wobei der Sprung des 4-Chlor-2-Nitrobenzaldehyd am geringsten ist. Im Verhalten nach dem pH-Sprung unterscheiden sich die Proben teilweise. So ist für 4-Br-2-NBA ein deutlich stärkerer Rückgang des pH-Wertes als für 2-Nitrobenzaldehyd zu beobachten. Auch im Vergleich zu den anderen halogenierten Nitrobenzaldehyd-Derivaten weist die bromierte Verbindung einen ungewöhnlich starken Anstieg auf. Da die Gründe für dieses Verhalten an dieser Stelle nicht vollständig geklärt werden konnten, soll hier nur auf den im Gleichgewicht erreichten pH-Wert eingegangen werden.



**Abbildung 54.** pH-Sprungverhalten der halogenierten 2-Nitrobenzaldehydderivate ( $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ;  $t_{exc} = 7 \text{ Pulse}$ ; die Lösungen enthalten  $3 \mu\text{M}$  Fluorescein; Glättung der Messwerte nach Savitzky-Golay, Polynom 2ter Ordnung)

Betrachtet man die pH-Werte im Gleichgewicht, so nimmt der pH-Sprung in folgender Reihenfolge ab:

2-NBA > 4-F-2-NBA > 4-Cl-2-NBA > 4-Br-2-NBA.

Diese Tendenz steht dem erwarteten Trend der  $pK_s$ -Werte der entstehenden Säuren und den Geschwindigkeitskonstanten der photolytischen Umsetzung bei  $366 \text{ nm}$  entgegen. Wie bereits beschrieben, besitzen die halogenierten Verbindungen eine geringfügig sinkende Säurekonstante als das 2-Nitrobenzaldehyd. Das bedeutet, dass bei gleicher Umsetzungsrate eine leicht erhöhte Neigung zur Freisetzung der Protonen vorhanden sein sollte.

Zusätzlich ist die erwartete Rate der Umsetzung im selben Maße erhöht, mit abnehmender Tendenz vom Brom zum Fluor. Dennoch werden geringere pH-Sprünge für diese Alternativsubstrate verzeichnet, wie in Abbildung 54 dargestellt ist. Zwar sind die Senkung der Säurekonstanten und die Erhöhung der Umsatzraten eher gering, dennoch wurde eine geringe Verbesserung erwartet. Neben den Säurekonstanten, hat der Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge einen entscheidenden Beitrag zur photolytischen Umsetzung. Hier konnten durch die Derivatisierung keine verbesserten spektralen Eigenschaften der Triggersubstrate erreicht werden. Durch die Einführung stärkerer Elektronendonatoren könnten hier höhere Extinktionskoeffizienten erreicht werden. Allerdings ist für die Einführung von Alkoxy-Gruppen bekannt, dass sowohl der  $pK_s$  des *aci*-Nitro-Intermediates, als auch seine Deprotonierungsausbeute ( $\phi_{H+}$ ) sinkt. [Abbruzzetti *et al.*, 2003] Daher gilt es in zukünftigen Messungen einen Kompromiss zwischen beiden, für die Entstehung des pH-Sprunges, relevanten Eigenschaften durch eine Derivatisierung zu erreichen. Weiterhin sollte eine mögliche Erhöhung der Löslichkeit in wässrigen Medien innerhalb der Derivatisierung Berücksichtigung finden. Abschließend bleibt festzustellen, dass keine der verwendeten Photoschalter eine signifikante Verbesserung im Vergleich zum 2-Nitrobenzaldehyd erbracht hat.

Um die auftretenden Instabilitäten des pH-Sprungsystems zu erforschen und um das Anregungssystem vollständig zu charakterisieren wurde der Strahlengang des Aufbaus II, Anregungssystem b in seiner geometrischen Auflösung untersucht. In Abschnitt 3.3.2 wurde bereits das geometrische Profil des Anregungsstrahlenganges beleuchtet. Dabei zeigte sich, ein mittlerer Durchmesser von 0,82 mm in x- und 0,57 mm in y-Richtung des Strahlenganges. Die bestrahlte Probelösung hingegen besitzt bei einem Volumen von 45  $\mu$ L Dimensionen von 2 x 2,25 x 10 mm (x,y,z-Ebene). Das bedeutet, dass lediglich eine Ausleuchtung von 41 % in x- und 4 % in y-Richtung stattfindet. Damit lässt sich auch der Anstieg des pH-Wertes nach dem eigentlichen Sprung erklären. Es kommt nach Anregung der Lösung zu einer Rückvermischung des un- bzw. vermindert angeregten Volumens, durch die eine Verdünnung der freigesetzten Protonen eintritt und der pH-Wert der Lösung ansteigt. Durch eine Aufweitung des Anregungsstrahlenganges und eine Anpassung der Geometrie des Strahlprofils konnte dieses Problem jedoch für die weiteren Messungen behoben werden. Dies führte zu einer Veränderung des geometrischen Strahlprofils im Anregungsstrahlengang (Abbildung 21, Abschnitt 3.3.2) und resultierend zu einer optimierten Ausleuchtung des Probenvolumens.

### 4.3.3. Untersuchung der photolytischen Reaktion durch Actinometermessungen

Bei der angegebenen Laserleistung von 2,4 W handelt es sich um die mittlere oder Durchschnittsleistung des Lasers. Die Leistung eines einzelnen Pulses, also die Spitzenleistung, wird aus der mittleren Leistung auf die Dauer eines Pulses berechnet. Für die ermittelte Pulslänge von 6 ns ergibt sich damit eine theoretische Spitzenleistung von rund 421000 W. Beide Leistungswerte entstammen der Messung mit einem Leistungsmessgerät, welches vor dem letzten Halbspiegel in den Strahlengang gebracht wurde. Aus apparativen Gegebenheiten war eine Messung hinter dem Halbspiegel im verwendeten Aufbau nicht möglich bzw. mit größerer Genauigkeit für die Messungen nicht notwendig. Um nun die Laserleistung zu ermitteln, die tatsächlich in die photolytische Reaktion eingebracht wird, wurden Actinometer-Messungen durchgeführt. Chemische Actinometer sind Substanzen von deren Umsatz sich direkt auf die Anzahl dafür benötigter Photonen schließen lässt. [Kuhn 2004] Anhand des ermittelten Umsatzes und bekannten Parametern, wie z. B. der Quantenausbeute, kann so die tatsächlich eingebrachte Leistung berechnet werden. 2-Nitrobenzaldehyd, dessen Photochemie gut charakterisiert ist und für das die notwendigen Parameter bekannt sind, gehört zu den Substanzen, die durch die IUPAC als Actinometer empfohlen werden [Kuhn *et al.*, 2004] und dessen Anwendung auch für einige Beispiele beschrieben ist. [Allen *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2004; Galbavy *et al.*, 2010] Nach Anregung der photochemischen Reaktion werden über die Änderung der optischen Dichte die Konzentrationsänderung des 2-Nitrobenzaldehydes und daraus der notwendige Photonenfluss ermittelt (Abschnitt 3.3.2).

**Tabelle 12.** Ermittelte Laserleistungen für die Photolysereaktion (ermittelt durch Actinometermessungen verschiedener 2-Nitrobenzaldehydkonzentrationen mit unterschiedlichen Pulseinträgen)

$C_{NBA}$ [ $\mu$ M]	Pulse	$P$ [W] <sup>a</sup>	$S_P$ [%]	Anzahl der Messungen	$P$ [%] <sup>b</sup>	$P$ [%] <sup>c</sup>
500	1	24446	9,9	6	5,8	57
500	7	22195	5,0	4	5,3	51
750	1	19212	5,0	5	4,6	45
750	7	16184	3,1	3	3,8	38

<sup>a</sup> ermittelte Laserleistung

<sup>b</sup> Prozent verwendeter Leistung bezüglich der Spitzenleistung 421 MW

<sup>c</sup> Prozent verwendeter Leistung bezüglich der nutzbaren Spitzenleistung 43 MW

In Tabelle 12 werden die Werte der ermittelten Leistungen zusammengefasst, wobei die Messungen sowohl für unterschiedliche Konzentrationen an 2-Nitrobenzaldehyd, als auch für Einzelpuls- sowie für Mehrpulsanregung durchgeführt wurden.

Zieht man den Vergleich der ermittelten Leistung zur Spitzenleistung von 421 MW, so werden lediglich 3 bis 5 % der theoretischen Laserleistung tatsächlich in der photolytischen Reaktion umgesetzt. Für eine genaue Betrachtung der Spitzenleistung müssen jedoch die hohe Transmission der Probelösung bei 355 nm von nahezu 75 % sowie die Quantenausbeute der Reaktion ( $\phi = 0,41$  [Galbavy *et al.*, 2010]) berücksichtigt werden. Unter Beachtung beider Faktoren ergibt sich eine für die Photolyse nutzbare Spitzenleistung von rund 43 MW. Legt man nun diese nutzbare Spitzenleistung zugrunde werden rund 40 bis 60 % der eingebrachten Leistung für die photolytische Umsetzung verwendet. Es ist zu beobachten, dass die Standardabweichung bei Mehrpulsbestrahlung deutlich gegenüber der Einzelpulsanregung verringert wird. Das lässt darauf schließen, dass die Laserleistung Schwankungen unterliegt. Darüber hinaus zeigen sowohl die Konzentration des Photoschalters als auch die Anzahl der Pulse einen Einfluss auf die tatsächlich verwendete Leistung. Bei Erhöhung der Konzentration an 2-Nitrobenzaldehyd sinkt die tatsächlich eingebrachte Laserleistung um 1,2 bis 1,4 %. Weiterhin ist auch bei Erhöhung der Anregungspulse ein Leistungsabfall zu beobachten. Der Grund für diesen Abfall ist in der einsetzenden Umlagerungsreaktion zu sehen. Während der Bestrahlung steigt die optische Dichte bei 355nm durch die Reaktion an. Diese steigende Absorption rührt allerdings von der bereits umgesetzten 2-Nitrosobenzoessäure. Das führt in der Konsequenz dazu, dass ein zunehmender Teil der Laserleistung durch das Produkt absorbiert wird und somit nicht mehr für die Photolyse zur Verfügung steht. Geht man bei zunehmender Substratkonzentration von einer gleichbleibenden Reaktionsgeschwindigkeit aus, so lassen sich die sinkenden Laserleistungen durch die vermehrte Produktabsorption erklären.

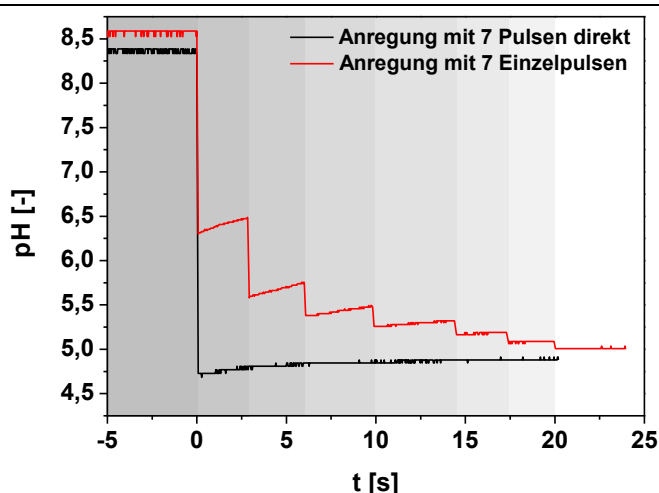
Die Actinometermessungen quantifizieren zwar den Energieeintrag in die photolytische Reaktion, lassen aber die (De)protonierungsprozesse außer Acht. Daher soll an dieser Stelle erneut der Vergleich zur theoretisch erreichbaren Hydroniumionenkonzentration gezogen werden. Analog zu Gleichung 5, 6 in Abschnitt 3.3.2 wird der für die hier vorliegenden Bedingungen maximal erreichbare pH-Wert ermittelt. Die Berechnung erfolgt nun unter der Berücksichtigung, dass bei einer verwendeten Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehyd und bei Anregung mit 7 Laserpulsen nur 51 % der eingestrahnten Laserleistung in die photolytische Reaktion eingehen. Dafür ergibt sich ein theoretisch erreichbarer pH-Wert von 4,35. Das bedeutet, dass die Abweichungen zu den theoretisch freisetzbaren Protonen 40 % betragen.

In Abschnitt 4.1.2 wurde bereits für die pH-Sprunggenerierung im Ti-Saphir-Lasersystem die Abweichung des experimentellen pH-Sprunges in der gleichen Größenordnung diskutiert. Wie an dieser Stelle soll auch hier eine kurze Betrachtung möglicher Gründe für diese Abweichungen erfolgen. Eine Limitierung des erreichbaren pH-Wertes als Effekt der Rückvermischung kann als Ursache nicht herangezogen werden, da im Zeitregime von ms ein Einfluss von Diffusionseffekten unwahrscheinlich

ist (vgl. Abschnitt 6.5.9 im Anhang). Auch kann weder eine geringfügige Restkonzentrationen an  $\text{CO}_2$ , noch der mögliche Energieverlust durch den nicht berücksichtigten Halbspiegel vollständig als Erklärung für diese Abweichung dienen. Es ist denkbar, dass die Anwesenheit und somit Protonierung des Fluoresceins in den pH-Messungen teilweise verantwortlich dafür ist, dass ein Teil der freigesetzten Protonen nicht für den pH-Sprung zur Verfügung steht. Es werden der Lösung  $3\ \mu\text{M}$  an Indikator zugesetzt. Das dafür verwendete Fluorescein besitzt 4 prototrophe Formen: das Monokation, das Neutramolekül, das Mono- und das Dianion. Bei pH 8 liegt fast ausschließlich das Dianion in wässriger Lösung vor, während bei pH 4,5 rund 68 % des Monanions und 32 % des Neutralatoms vorliegen. [Klonis und Sawyer, 1996] Damit werden etwa 20 % der fehlenden Protonen für die Protonierung des Indikators verwendet und stehen dem pH-Sprung nicht mehr zur Verfügung. Abschließend konnte nicht geklärt werden, ob damit alle Faktoren berücksichtigt wurden. Dies ist aber auch für die weiteren Messungen nicht relevant.

#### 4.3.4. Charakterisierung des pH-Sprungverhaltens des bevorzugten Anregungssystems

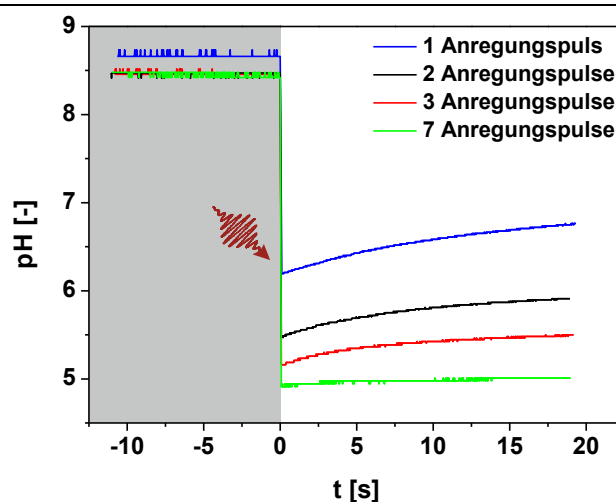
Der Übergang vom fs-Lasersystem zum ns-Lasersystem und die damit einhergehende Leistungserhöhung hat zum Ziel, dass volle Potenzial des 2-Nitrobenzaldehyds als Triggersubstrat auszuschöpfen. Das bedeutet die Realisierung des pH-Sprunges durch Anregung im Nanosekunden-Bereich. Im Folgenden wird das pH-Sprungverhalten des favorisierten pH-Sprungsystems beschrieben.



**Abbildung 55.** pH-Sprung einer  $500\ \mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehyd-Lösung im Vergleich von Einzelpuls- und Mehrpulsanregung (schwarz: Anregung mit 7 Pulsen direkt; rot: Anregung mit 7 aufeinanderfolgenden Pulsen;  $\lambda_{\text{exc}} = 355\ \text{nm}$ ;  $P = 2,4\ \text{W}$ ;  $t_{\text{exc}} = 7\ \text{ms}$ ; die Lösungen enthalten  $3\ \mu\text{M}$  Fluorescein)

Vergleichend wurde in einem Experiment neben der Anregung mit sieben Pulsen die Anregung mit sieben aufeinanderfolgenden Einzelpulsen analysiert. In Abbildung 55 sind zusammenfassend die pH-Sprünge der beiden Experimente dargestellt. Im Anregungsexperiment mit Einzelpulsen zeigt sich erneut, wie bereits diskutiert, ein anfänglicher pH-Wert im schwach sauren Bereich. Hier deutet sich trotz Optimierung der Ausleuchtung noch ein stark ansteigender Verlauf des pH-Wertes nach dem pH-Sprung an. Bei weiterer Anregung durch Einzelpulse sinkt der pH-Wert weiter ab, wobei die Größe des Sprunges, aber auch der spätere Anstieg des pH-Wertes, mit zunehmender Anzahl an Anregungspulsen deutlich abnimmt. Betrachtet man die Konzentration an erzeugten Hydroniumionen, so ist diese mit rund  $2\text{ }\mu\text{M}$  relativ konstant. Lediglich im ersten pH-Sprung wird nur eine Konzentration von rund  $0,5\text{ }\mu\text{M}$  freigesetzt. Ein möglicher Grund könnte in einer anfänglichen Protonierung des Indikators liegen. Die dafür verbrauchten Protonen stehen dem pH-Sprung nicht mehr zur Verfügung. Mit sieben Einzelpulsen konnte insgesamt ein pH-Shift von 3,5 pH-Einheiten erreicht werden. Der erzielte pH-Wert von 5,0 bietet ein gutes Potenzial, das auch nach der Zugabe der Komponenten des Enzymsystems ein ausreichend großer pH-Sprung möglich ist. Im Vergleich wurde mit einer Anregungszeit von sieben Millisekunden mit sieben Pulsen ein pH-Sprung von 3,7-pH-Einheiten ermittelt, wobei hier eine gute Stabilität auch nach dem Sprung vorhanden ist.

Im Folgenden wurde die Anzahl der Anregungspulse variiert um die minimale Anregungszeit zu ermitteln, mit der ein für das System hinreichender pH-Sprung erzielt werden kann. In Abbildung 56 ist das erwartete Absinken des pH-Sprunges mit sinkender Anzahl der Anregungspulse dargestellt.

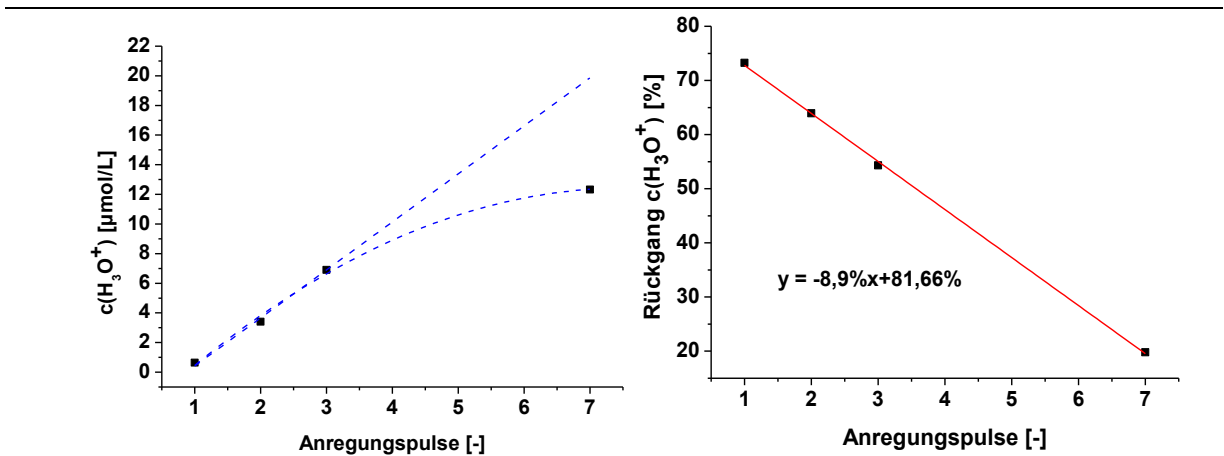


**Abbildung 56.** pH-Sprung einer  $500\text{ }\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehyd-Lösung bei variierender Anzahl von Anregungspulsen ( $\lambda_{\text{exc}} = 355\text{ nm}$ ;  $P = 2,4\text{ W}$ ; die Lösungen enthalten  $3\text{ }\mu\text{M}$  Fluorescein)

So kann mit einer Anregung von sieben Pulsen bereits ein pH-Wert von 4,9 erreicht werden, während durch eine Einzelpulsanregung immerhin ein initialer pH-Wert von 6,2 erreichbar ist.

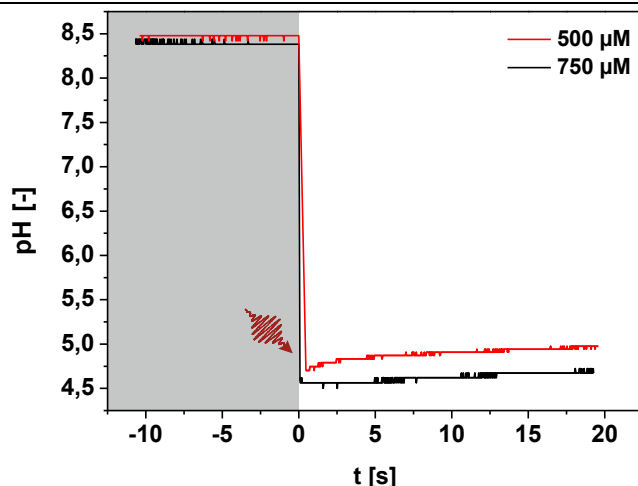


Die dabei anfänglich entstehende Hydroniumionenkonzentration für eins bis drei Anregungspulse ist zunächst proportional zur Anzahl der Anregungspulse und damit zur Anregungszeit (Abbildung 57, links). Beim Übergang zu höheren Anregungszeiten tritt jedoch eine Sättigung der Protonenfreisetzung ein. Betrachtet man den pH-Wert nach dem eigentlichen Sprung, so tritt auch hier, wie auch bei Anregung im Millisekunden-Bereich, ein Rückgang der Hydroniumionenkonzentration ein. Trägt man diesen Rückgang prozentual zur initial erzeugten Hydroniumionenkonzentration auf, so ergibt sich ein linear abnehmender Verlauf mit steigender Anregungszeit (Abbildung 57 rechts). So kommt es dazu, dass bei Anregung durch einen Einzelpuls ein Rückgang der Hydroniumionenkonzentration von mehr als 70 % der freigesetzten Hydroniumionenkonzentration stattfindet. Hingegen ist bei einer Anregung mit 7 Pulsen nur noch ein Verlust von rund 20 % der gebildeten Hydroniumionen durch die Rückvermischung zu verzeichnen.



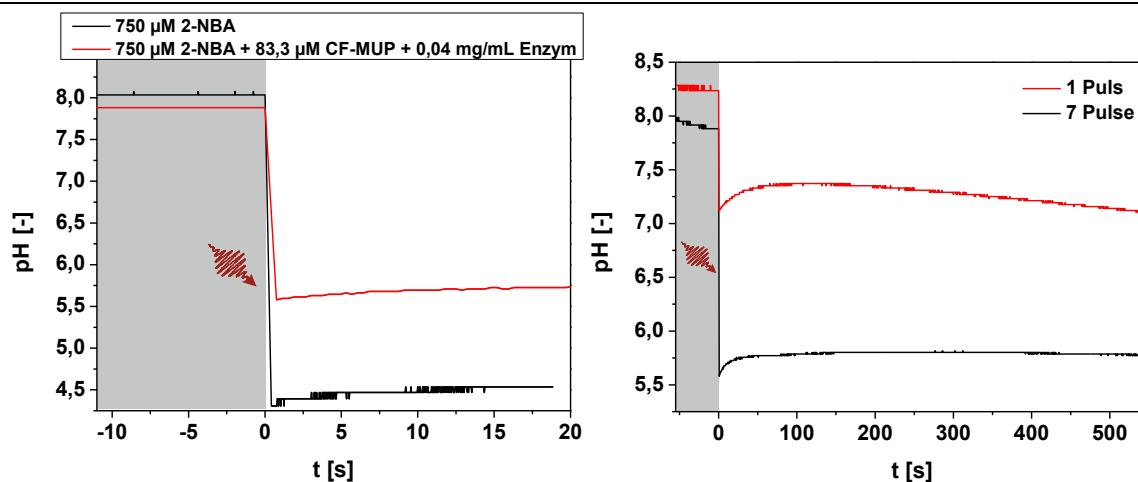
**Abbildung 57.** Initiale Hydroniumionenkonzentration (links) und Rückgang der Hydroniumionenkonzentration (rechts) bei variierender Anzahl der Anregungspulse (500  $\mu\text{M}$  2-NBA;  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ; 1–7 Anregungspulse, die Lösungen enthalten 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein)

Zusammenfassend betrachtet bedeutet das, dass unter diesen experimentellen Bedingungen die höchste Stabilität des pH-Wertes durch eine Anregung mit mehr als sieben Anregungspulsen gewährleistet ist. Unter Berücksichtigung der Pufferkapazität der Komponenten des Enzymsystems ist jedoch ein ausreichend großer pH-Sprung bereits mit drei Anregungspulsen erreichbar. Vergleichbare Bedingungen zu den Aktivierungsexperimenten mit dem Ti-Saphir-Laser im Millisekunden-Bereich erzielt man durch die Bestrahlung mit insgesamt sieben Anregungspulsen. Das bedeutet, für die Aktivierungsexperimente genügt eine theoretische Anregungszeit von 40 ns, was einer experimentellen Anregungszeitdauer von 7 ms entspricht. Um mehr Raum für die Pufferkapazität der Systemkomponenten zu schaffen, wurde im Weiteren die Konzentration des Triggersubstrates erhöht.



**Abbildung 58.** pH-Sprung einer 500  $\mu\text{M}$  und einer 750  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehyd-Lösung im Vergleich ( $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ;  $t_{\text{exc}} = 7 \text{ ms}$ ; die Lösungen enthalten 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein)

In Abbildung 58 wird hierzu vergleichend der pH-Sprung einer 500  $\mu\text{M}$  und einer 750  $\mu\text{M}$  2-NBA-Lösung mit 7 Anregungspulsen gezeigt. Während bei Bestrahlung einer 500  $\mu\text{M}$  2-NBA-Lösung der pH-Wert nach dem anfänglich erreichten pH-Wert von 4,8 leicht auf 5,0 ansteigt, erreicht man durch den Einsatz einer 750  $\mu\text{M}$  Lösung einen noch größeren pH-Sprung auf pH 4,6, der auch stabil auf 4,7 gehalten werden kann. Es ist also davon auszugehen, dass bei Zusatz von Enzym und Substrat ein ausreichend großer und stabiler pH-Sprung realisierbar ist.



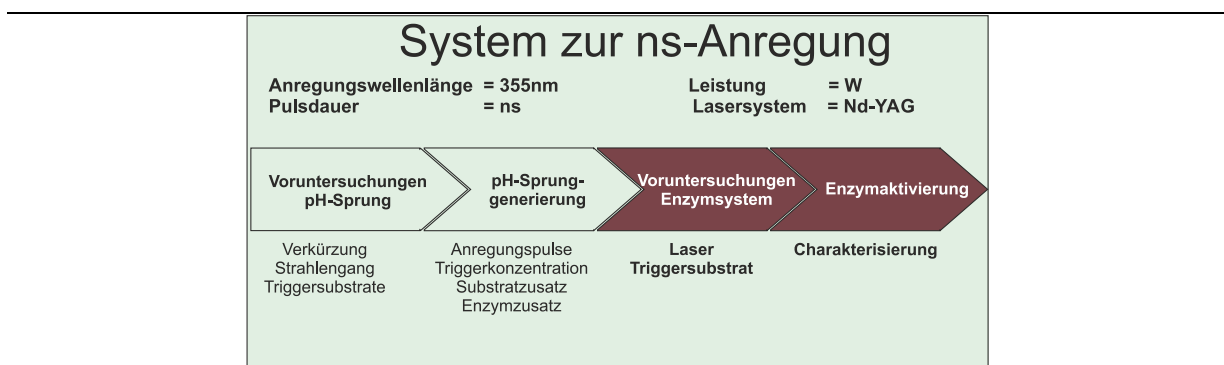
**Abbildung 59.** pH-Sprung einer 750  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehyd-Lösung im reinen pH-Sprung- und im enzymatischen Gesamtsystem für die Anregung mit 7 Pulsen (links) und Langzeitaufnahme des pH-Sprungsverhaltens im enzymatischen Gesamtsystem für die Einzelpulsanregung und für die Anregung mit 7 Pulsen (rechts) ( $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ; links: 750  $\mu\text{M}$  2-NBA; rechts: 750  $\mu\text{M}$  2-NBA + 0,04 mg/mL saure Phosphatase + 83,3  $\mu\text{M}$  CF-MUP; die Lösungen enthalten 3  $\mu\text{M}$  Fluorescein)

Nachdem der pH-Sprung für 2-Nitrobenzaldehyd als Einzelkomponente charakterisiert war, sollte auch im Gesamtsystem der pH-Sprung realisiert werden, um eine Enzymaktivierung zu erreichen. Im linken Graphen der Abbildung 59 sind die pH-Sprünge für die Anregung mit 7 Pulsen veranschaulicht.

Während in reiner 2-Nitrobenzaldehydlösung initial ein pH-Wert von 4,3 erreicht wird, steht dem ein pH-Wert von 5,6 im Gesamtsystem gegenüber. Bei beiden Systemen ist der Anstieg nach dem Sprung als eher geringfügig anzusehen, wobei hier eine leichte Stabilitätserhöhung im Gesamtsystem vermerkt werden konnte. Bei Betrachtung der Langzeitmessung in Abbildung 59 (rechts) verzeichnet man, nach dem kurzfristigen Anstieg, für die Anregung mit 7 Pulsen eine gute Stabilität des erreichten pH-Wertes. Für die Einzelpulsanregung zeigt sich nach einem kurzfristigen Anstieg nach ca. 25 Sekunden ein Abfall des pH-Wertes. Diese Instabilität könnte aus einer eintretenden Enzymreaktion resultieren. Durch die Einzelpulsanregung gelangt man im gesamten enzymatischen System in den neutralen pH-Bereich. In diesem Bereich genügen bereits sehr viel geringere Konzentrationen an Hydroniumionen im Vergleich zum sauren Bereich um eine Änderung des pH-Wertes zu generieren. Abschließend kann für die folgenden Aktivierungsexperimente zusammengefasst werden, dass durch die Anregung mit 7 Pulsen ein pH-Bereich erreicht wird, in dem das Enzym nahezu maximale Aktivität besitzt. Bei Einzelpulsanregung wird ein Sprung in den neutralen Bereich erzeugt, woraus resultierend eine geringe Aktivierung des Enzyms zu erwarten ist.

#### 4.4. Untersuchung zur laserinduzierten Enzymaktivierung durch Anregung im Nanosekunden-Bereich

Mit der erfolgreichen pH-Sprunggenerierung konnte der erste Schritt der Enzymaktivierung bereits dargestellt werden. In einem nächsten Schritt wurde erneut die Kompatibilität der verwendeten Reaktionsbedingungen auf die enzymatische Komponente des Aktivierungssystems geprüft.



Bei Übergang der Anregungswellenlänge zu 355 nm unter gleichzeitiger Erhöhung der verwendeten Laserleistung, wie es durch die Verwendung des Nd-YAG-Lasers der Fall war, musste erneut die Stabilität des Enzyms unter den verwendeten Reaktionsbedingungen beurteilt werden.

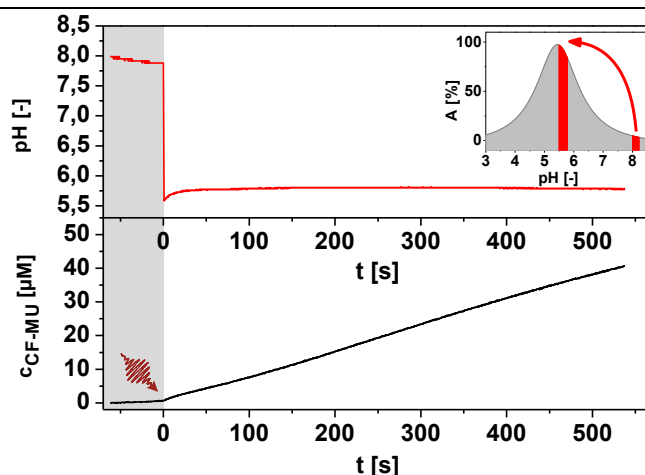
Dazu wurde, wie schon zuvor in Abschnitt 4.2.5 beschrieben, die Enzymaktivität mit und ohne die Bestrahlung durch den Laser, sowie vor und nach der Anregung bestimmt. Dabei zeigen die Messungen (detaillierte Daten und Ausführungen sind im Anhang unter Abschnitt 6.5.9 zu finden), dass von einer verlustfreien Anregung ausgegangen werden kann. Das Enzym weist demnach auch bei deutlicher Erhöhung der Laserleistung gegenüber der langwelligen UV-Strahlung eine hohe Stabilität auf. Zusätzlich kann die Einführung verschiedener Substituenten einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Daher sollte das Ergebnis für den Einfluss des 2-Nitrobenzaldehydes bestätigt und um den Einfluss der halogenierten Nitrobenzaldehyde erweitert werden. Es kann dabei festgestellt werden, dass der Einsatz der photoaktivierbaren Verbindungen die Aktivität der sauren Phosphatase beeinflusst, dieser Einfluss aber vergleichsweise gering und damit tolerierbar ist. Für weitere Details sind die vollständigen Daten und Ausführungen dem Anhang unter Abschnitt 6.5.11 beigelegt.

### **4.4.1. Untersuchung der laserinduzierten Enzymaktivierung**

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass durch die Halogenierung des 2-Nitrobenzaldehydes keine Verbesserung des pH-Sprungs erreichbar war. Zwar ist in Gegenwart der 2-Nitrobenzaldehydderivate eine leicht erhöhte Enzymaktivität zu verzeichnen, aber ein entscheidender Nachteil der Derivate ist die sinkende Löslichkeit in Wasser. Daher ist das favorisierte System für die Enzymaktivierung weiterhin im 2-Nitrobenzaldehyd zu sehen, wobei eine Konzentration an Triggersubstrat von 750  $\mu\text{M}$  verwendet wird. Durch die Verwendung dieses Systems konnte auch für die Anregung mit dem Nanosekunden-Lasersystem eine Enzymaktivierung erfolgreich durchgeführt werden, welche in diesem Abschnitt dargestellt und diskutiert wird.

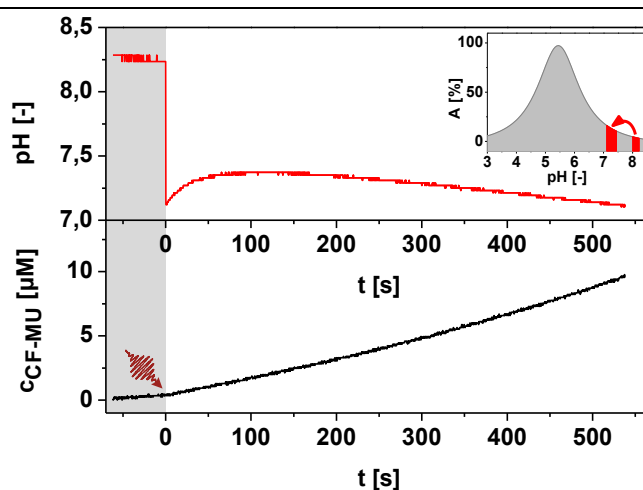
Da durch die Bestrahlung mit sieben Anregungspulsen die besten Ergebnisse für den pH-Sprung in Größe und Stabilität erzielt wurden, erfolgte zunächst auch die Enzymaktivierung unter diesen Bedingungen. In Abbildung 60 wird dabei der zeitliche Verlauf beider Komponenten des Systems über einen Zeitraum von 10 Minuten gezeigt. Während im oberen Teil des Diagramms die zeitliche Verfolgung des pH-Sprungs aufgetragen ist, wird dem unten die daraus resultierende Aktivierung der hydrolytischen Aktivität gegenübergestellt.

Vor der Anregung des pH-Sprungs bei pH 8 ist keine signifikante hydrolytische Aktivität detektierbar. Durch die Anregung mit einer Wellenlänge von 355 nm und sieben Anregungspulsen wird ein pH-Sprung bis auf einen pH-Wert von 5,8 generiert. Dies wiederum führt zum Einsetzen der hydrolytischen Umsetzung durch die saure Phosphatase. Nach der Aktivierung des Enzyms konnte eine Reaktionsgeschwindigkeit von 0,11  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{Lyophilisat}})$  bei einem Einsatz von 0,04 mg/mL saurer Phosphatase ermittelt werden.



**Abbildung 60.** Laserinduzierte Aktivierung der enzymatischen Hydrolyse für die Mehrpulsanregung ( $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ;  $t_{exc} = 7 \text{ Pulse}$ ;  $0,04 \text{ mg/mL}$  saure Phosphatase +  $83,3 \text{ µM}$  CF-MUP in  $150 \text{ mM}$  Acetatpuffer pH 5,5) Inset-Graphik: Veranschaulichung des erzielten pH-Sprunges im Aktivitätsprofil der Phosphatase

Das entspricht einer nahezu achtfachen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Reaktionsrate vor dem laserinduzierten pH-Sprung. Die ermittelte Aktivierungsrate ist damit konsistent zu der durch den Ti-Saphir-Laser erreichbaren Aktivierung. Durch die Mehrfachbestimmung der Aktivierung wurden jedoch Schwankungen für die Aktivität nach der Anregung registriert. Unter Berücksichtigung aller erhaltenen Ergebnisse ergab sich dabei eine mittlere Aktivierungsrate von Faktor sieben. Darüber hinaus wurde geprüft, ob durch die Anregung mit einem einzelnen Anregungspuls eine Aktivierung des Enzyms möglich ist. In Abbildung 61 wird die zeitliche Verfolgung des Aktivierungsexperimentes unter Einzelpulsanregung graphisch dargestellt.



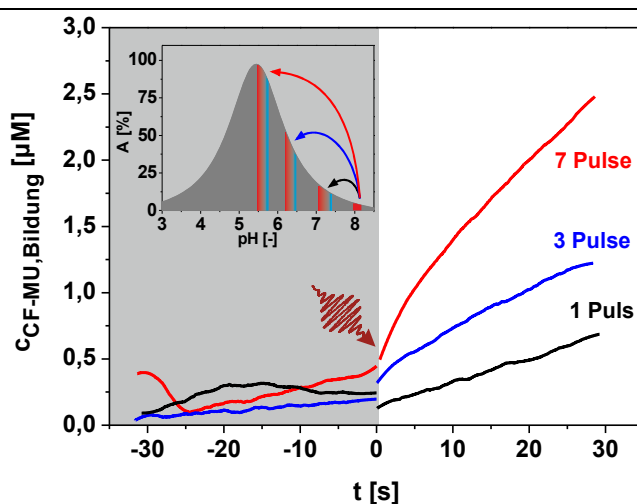
**Abbildung 61.** Laserinduzierte Aktivierung der enzymatischen Hydrolyse für die Einzelpulsanregung ( $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ;  $t_{exc} = 6 \text{ ns}$ ;  $0,04 \text{ mg/mL}$  saure Phosphatase +  $83,3 \text{ µM}$  CF-MUP in  $150 \text{ mM}$  Acetatpuffer pH 5,5) Inset-Graphik: Veranschaulichung des erzielten pH-Sprunges im Aktivitätsprofil der Phosphatase

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass auch durch eine Anregung von 6 ns eine Enzymaktivierung initiiert werden kann. Hier konnte im Mittel über mehrere Messungen eine Aktivierung des Enzyms um das Vierfache erreicht werden.

Wie bereits diskutiert kommt es bei Verfolgung der Langzeitmessung zum Abfall des pH-Wertes. Daneben ist hier ein Zuwachs der Aktivität über den Messzeitraum erkennbar. Es ist denkbar, dass diese ansteigende Aktivität aus dem Abfall des pH-Wertes rührt. Durch die Senkung des pH-Wertes in den sauren pH-Bereich gelangt man im pH-Profil weiter in den aktiven Bereich des Enzyms, was zu einer weiteren Erhöhung der Umsatzrate führt.

In Abbildung 62 wird zusammenfassend die zeitliche Verfolgung der Aktivierung in Abhängigkeit der Anzahl der Anregungspulse gezeigt. Aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung und der geringen Änderung der Produktkonzentration weist die Abbildung ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf. Aus diesem Grund wurden die Kurven einer Glättung unterzogen (die Original-Messkurven befinden sich im Anhang unter Abbildung 74).

Es zeigt sich, dass in den Anregungsexperimenten nach der pH-Sprungerzeugung ohne zeitliche Verzögerung eine signifikante Enzymaktivierung eintritt. Daher kann man davon ausgehen, dass das Enzym in weniger als 26 ms (bedingt durch die zeitliche Auflösung der Detektion) auf den erzeugten pH-Sprung reagiert.



**Abbildung 62.** Laserinduzierte Aktivierung der enzymatischen Hydrolyse in Abhängigkeit der Anregungszeit ( $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ;  $t_{exc} = 1, 3, 7 \text{ Pulse}$ ;  $0,04 \text{ mg/mL}$  saure Phosphatase +  $83,3 \text{ µM}$  CF-MUP in  $150 \text{ mM}$  Acetatpuffer pH 5,5)

Vergleicht man die Reaktionsraten der Enzymaktivierungen so ist erkennbar, dass mit zunehmender Anzahl der Anregungspulse die resultierende Reaktionsrate steigt. Dies ist bedingt durch den dabei zunehmenden pH-Sprung, was in der innenliegenden Auftragung der Abbildung 62 graphisch veranschaulicht wird. Durch die steigende Anzahl an Anregungspulsen wird ein zunehmend saures

pH-Milieu erzeugt. Bedingt durch das Aktivitätsprofil der sauren Phosphatase resultiert daraus eine steigende Aktivierungsrate des Enzyms. Bei zeitlicher Betrachtung der Produktbildung fällt auf, dass sowohl die Aktivierung mit sieben Anregungspulsen, als auch die Aktivierung mit drei Anregungspulsen keinen linearen Zusammenhang aufweisen. Hier kommt es zu einem Rückgang der Produktbildung im Verlauf der Reaktion. Der mögliche Grund für dieses Phänomen könnte in den Instabilitäten des pH-Wertes liegen. Wie in der Inset-Graphik angedeutet, findet zunächst ausgehend von pH 8 der pH-Sprung statt, wobei der initial erreichte pH-Wert durch die rote Fläche gekennzeichnet ist. Im Laufe der Reaktion jedoch steigt der pH-Wert wieder an, was durch den Übergang der rot gekennzeichneten Fläche zur blauen Fläche veranschaulicht wird. Das bedeutet, durch eine Anregung mit sieben Laserpulsen kommt es zu einem pH-Sprung auf einen anfänglichen pH-Wert von rund 5,5 und daraus resultierend zu einer nahezu 100 %igen Aktivierung. Anschließend steigt der pH-Wert innerhalb der im Experiment verfolgten 30 Sekunden auf 5,8 an. In der Konsequenz sinkt auch die Aktivität des Enzyms um ca. 15 %. Auch für die Anregung mit drei Pulsen bedeutet der Rückgang des pH-Wertes einen rund 15 %igen Aktivitätsverlust. Anders ist das für die Einzelpulsanregung. Zwar ist auch hier einen Rückgang des pH-Wertes zu verzeichnen, dieser wirkt sich jedoch mit rund 6 % Aktivitätsverlust kaum auf die ohnehin geringere Reaktionsrate aus. Dadurch ist in der Einzelpulsanregung die Beobachtung eines linearen Verlaufes der Produktbildung die Folge der Aktivierung.

Durch die Anwendung des Nd-YAG-Lasersystems für die pH-Sprunginitiierung konnte erfolgreich bei gleicher Aktivierungsrate für das Enzym die Anregungszeit um Faktor 35 auf sieben ms gesenkt werden. Zusätzlich konnte mit diesen Messungen gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Enzymreaktion auch nach einer Einzelpulsanregung stattfindet. Es konnte unter den experimentellen Bedingungen eine vierfache Enzymaktivierung realisiert werden. Damit ist es nach bestem Wissen erstmals gelungen eine lichtinduzierte Steuerung der hydrolytischen Enzymfunktion durch Anregung eines pH-Sprunges im Nanosekunden-Bereich zu erlangen. Für die Abfrage der Reaktion stünde damit theoretisch eine Zeitauflösung des einsetzenden enzymatischen Prozesses von theoretisch 20 ns (begrenzt durch die Geschwindigkeit der Deprotonierung des 2-Nitrobenzaldehydes [Donten *et al.*, 2011]) zur Verfügung. Die hier eingesetzte Detektion bietet den Vorteil, dass nicht nur selektiv charakteristische Wellenlängen, sondern das vollständige Spektrum über den gesamten Prozess interpretierbar ist. Somit ist die simultane Detektion des pH-Sprunges und der einsetzenden Enzymreaktion möglich. Darüber hinaus, können aber auch mögliche Nebenreaktionen oder abweichende Prozesse verfolgt werden. Da die ablaufenden Prozesse auf diesem Weg ausreichend charakterisiert werden konnten, ist es nun in zukünftigen Messungen möglich und notwendig eine Abfrage zu realisieren, die zwar den Vorteil der Interpretation des Gesamtspektrums verliert, jedoch an Zeitauflösung gewinnt.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz ultrakurzer Laserpulse als Schalter enzymatischer Funktionen geprüft. Das zentrale Ziel war die Entwicklung einer Methode zur **lichtinduzierten Steuerung enzymatischer Aktivitäten**. Die vorgestellte Methode ist, im Gegensatz zu den bereits bestehenden Aktivierungsmethoden, nicht auf eine bestimmte Klasse von Enzymen beschränkt und erweitert somit das Spektrum aktivierbarer Enzyme. Der Ansatz basiert auf der sprunghaften Änderung des pH-Wertes innerhalb eines enzymatischen Reaktionssystems. Der laserinduzierte pH-Sprung wird durch die Protonenfreisetzung aus der Umlagerung von 2-Nitrobenzaldehyd erzeugt. Daraus resultiert eine Verschiebung der Bedingungen zu einem für das Enzym aktiven Milieu. Als Ergebnis dieser sprunghaften Änderungen wird schließlich die enzymatische Funktion initiiert. Neben der erhöhten Vielseitigkeit dieser Aktivierungsmethode soll sie auch den Vorteil einer hohen zeitlichen Auflösung für die spätere Anwendung in Echtzeitanalysen einschließen.

Im ersten Teil der Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf der Demonstration des Messprinzips. Dazu standen zunächst die Entwicklung eines geeigneten experimentellen Aufbaus sowie die Charakterisierung des 2-Nitrobenzaldehydes und die Erzeugung eines ausreichend großen und stabilen pH-Sprunges im Vordergrund. Parallel dazu wurde ein optimales enzymatisches Testsystem ermittelt und charakterisiert. Durch die **Anregung der pH-Sprunggenerierung im ms-Bereich** konnte dann das Konzept der laserinduzierten pH-Sprungaktivierung nachgewiesen werden.

Basierend auf den durchgeführten Untersuchungen wurden die folgenden Erkenntnisse gewonnen:

- i Die Anregung der Photolyse kann bei hoher eingebrachter Laserleistung auch, abseits des Absorptionsmaximums des 2-Nitrobenzaldehydes, im langwelligen UV-Bereich bei 388 nm erfolgen. Die Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante korreliert dabei mit dem Zuwachs an Photonen. In der Konsequenz bedeutet das, dass eine Anregungswellenlänge, die mit hoher Leistung generierbar ist, einer Anregungswellenlänge mit hoher Absorption durch das Photosubstrat vorzuziehen ist.
- ii Die saure Phosphatase eignet sich aufgrund ihres signifikanten pH-abhängigen Aktivitätsprofils für die externe Steuerung der Aktivität über den pH-Wert. Die Wahl der geeigneten Reaktion muss dabei sorgfältig unter Berücksichtigung der spektralen Eigenschaften aller Komponenten und der Akzeptanz des Substrates durch das Enzym getroffen werden. Für die vorliegende Arbeit wurde die Hydrolyse von 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferonphosphat (CF-MUP) zu 6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferon (CF-MU) als geeignete Testreaktion identifiziert.



- iii Für das Substrat der sauren Phosphatase wurden kinetische Daten bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit dem pH-abhängigen Aktivitätsprofil folgt, steigt die Michaelis-Menten Konstante mit steigendem pH-Wert stark an.
- iv Die Anwesenheit des Enzyms und seines Substrates hat entscheidenden Einfluss auf die realisierbare Größe des pH-Sprunges. Für das enzymatische Gesamtsystem konnte dabei ein pH-Sprung von rund 2 pH-Einheiten von pH 8 auf pH 6 realisiert werden. Damit konnte das System auf einen pH-Wert nahe dem Aktivitätsoptimum des Enzyms gebracht werden.
- v Die verwendete saure Phosphatase aus der Kartoffel zeigt eine hohe Stabilität sowohl gegenüber Strahlung im langwelligen UV-Bereich als auch gegenüber der Anwesenheit des Triggersubstrates 2-Nitrobenzaldehyd und seines Photoproduktes in den verwendeten Konzentrationen. Somit kann eine verlustfreie Anregung der Enzymaktivität durch den pH-Sprung realisiert werden.

Nach der Charakterisierung der einzelnen Komponenten des Aktivierungssystems konnte im Gesamtsystem die Möglichkeit der externen Kontrolle der Enzymaktivität durch einen laserinduzierten pH-Sprung erfolgreich belegt werden. In Abhängigkeit der Enzymkonzentration wurde eine steigende resultierende Aktivität ermittelt. Durch die **Methode der laserinduzierten pH-Sprungaktivierung** konnte zudem eine nahezu **vollständige Aktivierung** belegt werden.

Nachdem die Methode der lichtgesteuerten Enzymaktivierung im ms-Bereich erfolgreich dokumentiert wurde, stand im zweiten Teil der Arbeit die Verkürzung der benötigten Anregungszeit für die pH-Sprunggenerierung im Mittelpunkt. Um das volle Potenzial des 2-Nitrobenzaldehydes auszuschöpfen wurde eine **Anregung des pH-Sprunges im Nanosekunden-Bereich** angestrebt.

- i Eine Verkürzung der benötigten Anregungszeit um Faktor 35 konnte zum einen durch eine leichte Verschiebung der Anregungswellenlänge von 388 auf 355 nm, noch wichtiger jedoch durch eine erneute Leistungssteigerung des Anregungsstrahlengangs erreicht werden.
- ii Neben der Möglichkeit der apparativen Optimierung wurde zudem die Derivatisierung der verwendeten Triggersubstanz zur Steigerung des realisierbaren pH-Sprunges getestet. Für alle getesteten Halogenderivate des 2-Nitrobenzaldehydes konnte nur eine geringfügige Verbesserung charakteristischer Parameter ermittelt werden. Eine Verbesserung des erzeugbaren pH-Sprunges konnte nicht erreicht werden.
- iii Die Einzelpulsanregung, das bedeutet die Anregung für 6 ns, führt zu einem pH-Sprung in das neutrale pH-Milieu. In der Konsequenz kam es auch hier zu einer Aktivierung des Enzyms.

Es konnte für die Verkürzung der Anregungszeit um Faktor 35 auf sieben ns ein vergleichbarer pH-Sprung initiiert und somit die **gleiche Aktivierungsrate** für das Enzym wie für das Millisekunden-Lasersystem erreicht werden.

Zusätzlich konnte mit diesen Messungen gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Enzymreaktion auch nach einer Einzelpulsanregung detektiert wird. Damit ist es erfolgreich gelungen eine optische Steuerung der Enzymreaktion durch **Anregung im Nanosekunden-Bereich** zu erlangen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die **Reaktion des Enzyms auf den pH-Sprung in weniger als 26 ms** erfolgt.

Die vorgestellte Arbeit zeigt das **große Potenzial der laserinduzierten Enzymaktivierung für mögliche Anwendungen in der Echtzeitanalyse proteinogener Systeme**. Aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen ergeben sich verschiedene Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen:

### **Apparative Entwicklungen**

In der momentanen experimentellen Anordnung erfolgt die Detektion durch Aufnahme des vollständigen UV-Vis-Spektrums. Das bietet den Vorteil, dass alle Prozesse des komplexen Systems verfolgbar und interpretierbar sind. Die Aufnahme des Spektrums hat jedoch den Nachteil, dass ihre zeitliche Auflösung auf den Zeitbereich von Millisekunden beschränkt ist.

Eine Möglichkeit die zeitliche Auflösung zu erhöhen, wäre der Einsatz eines Absorptionsspektrometers dessen Auflösung im  $\mu\text{s}$ -Bereich liegt. Leider geht diese Erhöhung der Zeitauflösung mit einer Senkung der Empfindlichkeit einher. Darüber hinaus wäre die Detektion weiterhin um Größenordnungen langsamer als die Anregung des pH-Sprunges.

Im Rahmen der Arbeit konnten die Prozesse des verwendeten Systems charakterisiert werden. Daher kann in einem nächsten Schritt die Detektion über einzelne charakteristische Wellenlängen realisiert werden. Dies bietet den Vorteil, dass eine Detektion mit einer erhöhten Zeitauflösung in der Größenordnung der Anregung entwickelt werden kann.

### **Entwicklung des pH-Sprungsystems**

Um die entwickelte Methode zu erweitern, könnte das System auf die Anwendung weiterer photolabiler Substanzen für die Protonenfreisetzung ausgedehnt werden. Ferner ist auch der Einsatz von Photosäuren von Interesse, um auch die Erzeugung reversibler pH-Sprünge zu nutzen.

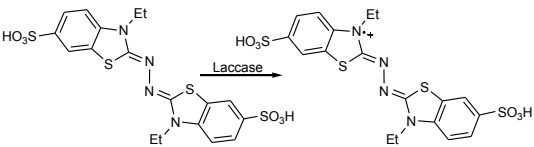
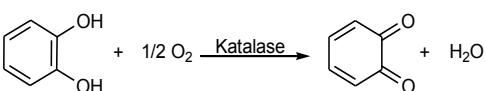
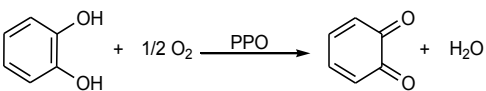
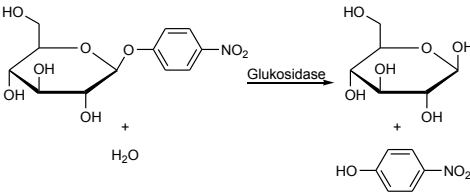
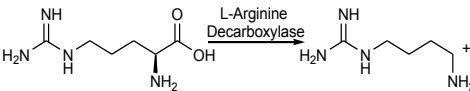
### **Entwicklung des enzymatischen Systems**

Eine Erhöhung der Zeitauflösung um mehrere Größenordnungen muss auch die Erhöhung der Empfindlichkeit der Detektion der Enzymaktivität zur Folge haben. Zusätzlich ist es für die Detektion vorteilhaft, wenn vor der Aktivierung kein Produktsignal detektierbar ist.

Ein Beispiel für ein derartiges Detektionssystem wurde kürzlich vorgestellt. Guo *et al.* entwickelten ein neuartiges Fluoreszenzdetektionssystem für Phosphataseaktivitäten. [Guo *et al.*, 2013] Dieses Detektionssystems beruht auf der Schaltung der Fluoreszenz des Produktes durch den enzymatischen Abbau eines Fluoreszenzquenchers.

Da die vorgestellte Aktivierungsmethode lediglich auf der lichtinduzierten Schaltung des pH-Wertes beruht, ist eine Anwendung auf eine Vielzahl weiterer Enzyme denkbar, wobei man nicht an die natürliche Lichtempfindlichkeit oder die Anwendung spezieller bioaktiver Verbindungen gebunden ist.

**Tabelle 13.** Beispielenzyme für die Erweiterung der lichtinduzierten pH-Wertkontrolle der Enzymaktivität

EC-Nummer	Enzym	Organismus	Reaktion	$\Delta\text{pH}$	Lit.
1.10.3.2	Laccase	<i>Trametes versicolor</i>		7–4	<sup>a</sup>
1.11.1.6	Katalase	<i>Bos primigenius taurus</i>		9–8	<sup>a, b</sup> [Vetrano <i>et al.</i> , 2005]
1.14.18.1	Poly-phenol Oxidase	<i>Solanum lycopersicum</i>		10–8	[Saeidian, 2012]
3.2.1.21	$\beta$ -Glukosidase	<i>Prunus amygdalus</i>		8–5,5	[Bowers <i>et al.</i> , 2007]
4.1.1.19	L-Arginin Decarboxylase	<i>E. coli</i>		8–6	[Blethen <i>et al.</i> , 1968]

<sup>a</sup> eigene Daten, <sup>b</sup> Literaturstelle berichtete über Katalase-Oxidase-Aktivität

Ein vielversprechender Kandidat ist dabei die  $\beta$ -Glukosidase. Aber auch abseits der Hydrolasen findet man weitere anwendbare Enzymsysteme, so z. B. Laccasen, Katalasen oder Decarboxylasen. Eine Auswahl möglicher Kandidaten ist in Tabelle 13 zusammengestellt.

## 6. Anhang

### 6.1. Literatur

Abbruzzetti, S., Crema, E., Masino, L., Vecli, A., Viappiani, C., Small, J. R., Libertini, L. J. und Small, E. W. "Fast events in protein folding: Structural volume changes accompanying the early events in the N → I transition of apomyoglobin induced by ultrafast pH jump." *Biophysical Journal* (2000a) 78 (1): 405-415.

Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Small, J. R., Libertini, L. J. und Small, E. W. "Kinetics of local helix formation in poly-L-glutamic acid studied by time-resolved photoacoustics: Neutralization reactions of carboxylates in aqueous solutions and their relevance to the problem of protein folding." *Biophysical Journal* (2000b) 79 (5): 2714-2721.

Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Small, J. R., Libertini, L. J. und Small, E. W. "Kinetics of histidine deligation from the heme in GuHCl-unfolded Fe(III) cytochrome c studied by a laser-induced pH-jump technique." *Journal of the American Chemical Society* (2001) 123 (27): 6649-6653.

Abbruzzetti, S., Carcelli, M., Rogolino, D. und Viappiani, C. "Deprotonation yields, pK(a), and aci-nitro decay rates in some substituted o-nitrobenzaldehydes." *Photochemical & Photobiological Sciences* (2003) 2 (7): 796-800.

Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Sinibaldi, F. und Santucci, R. "Kinetics of Histidine Dissociation From the Heme Fe(III) in N-fragment (residues 1–56) of Cytochrome c." *The Protein Journal* (2004) 23 (8): 519-527.

Abbruzzetti, S., Grandi, E., Viappiani, C., Bologna, S., Campanini, B., Raboni, S., Bettati, S. und Mozzarelli, A. "Kinetics of acid-induced spectral changes in the GFPmut2 chromophore." *Journal of the American Chemical Society* (2005a) 127 (2): 626-635.

Abbruzzetti, S., Sottini, S., Viappiani, C. und Corrie, J. E. T. "Kinetics of Proton Release after Flash Photolysis of 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Sulfate (Caged Sulfate) in Aqueous Solution." *Journal of the American Chemical Society* (2005b) 127 (27): 9865-9874.

Abbruzzetti, S., Bruno, S., Faggiano, S., Grandi, E., Mozzarelli, A. und Viappiani, C. "Time-resolved methods in Biophysics. 2. Monitoring haem proteins at work with nanosecond laser flash photolysis." *Photochemical & Photobiological Sciences* (2006a) 5 (12): 1109-1120.

Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Sottini, S. und Corrie, J. E. T. "Acid-induced unfolding of myoglobin triggered by a laser pH jump method." *Photochemical & Photobiological Sciences* (2006b) 5: 621–628.

Abbruzzetti, S., Bizzarri, R., Luin, S., Nifosi, R., Storti, B., Viappiani, C. und Beltram, F. "Photoswitching of E222Q GFP mutants: "concerted" mechanism of chromophore isomerization and protonation." *Photochemical & Photobiological Sciences* (2010) 9 (10): 1307-1319.

- Addison, K., Conyard, J., Dixon, T., Page, P. C. B., Solntsev, K. M. und Meech, S. R. "Ultrafast Studies of the Photophysics of Cis and Trans States of the Green Fluorescent Protein Chromophore." *Journal of Physical Chemistry Letters* (2012) 3 (16): 2298-2302.
- Agmon, N. "Elementary steps in excited-state proton transfer." *Journal of Physical Chemistry A* (2005) 109 (1): 13-35.
- Ai, Y.-J., Liao, R.-Z., Fang, W.-H. und Luo, Y. "Theoretical studies on the isomerization mechanism of the ortho-green fluorescent protein chromophore." *Physical Chemistry Chemical Physics* (2012) 14 (38): 13409-13414.
- Allen, J. M., Allen, S. K. und Baertschi, S. W. "2-Nitrobenzaldehyde: a convenient UV-A and UV-B chemical actinometer for drug photostability testing." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2000) 24 (2): 167-178.
- Alvarez, E. F. "Kinetics and Mechanism of Hydrolysis of Phosphoric Acid Esters by Potato Acid Phosphatase." *Biochimica Et Biophysica Acta* (1962) 59 (3): 663-672.
- An, H.-Y., Kwok, W. M., Ma, C., Guan, X., Kan, J. T. W., Toy, P. H. und Phillips, D. L. "Photophysics and Photodeprotection Reactions of p-Methoxyphenacyl Phototriggers: An Ultrafast and Nanosecond Time-Resolved Spectroscopic and Density Functional Theory Study." *Journal of Organic Chemistry* (2010) 75 (17): 5837-5851.
- Anand, A. und Srivastava, P. K. "A Molecular Description of Acid Phosphatase." *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2012) 167 (8): 2174-2197.
- Arnaut, L. G. und Formosinho, S. J. "Excited-State Proton-Transfer Reactions .1. Fundamentals and Intermolecular Reactions." *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* (1993) 75 (1): 1-20.
- Atkins, P. W. und Paula, J. D. "Physikalische Chemie" Weinheim, Wiley-VCH Verlag, 5. überarbeitete Auflage (2013).
- Barth, A., Corrie, J. E. T., Gradwell, M. J., Maeda, Y., Mantele, W., Meier, T. und Trentham, D. R. "Time-resolved infrared spectroscopy of intermediates and products from photolysis of 1-(2-nitrophenyl)ethyl phosphates: Reaction of the 2-nitrosoacetophenone byproduct with thiols." *Journal of the American Chemical Society* (1997) 119 (18): 4149-4159.
- Barth, A. und Corrie, J. E. T. "Characterization of a new caged proton capable of inducing large pH jumps." *Biophysical Journal* (2002) 83 (5): 2864-2871.
- Becker, H. G. O. "Einführung in die Photochemie" Berlin, Deutscher Verlag der Wissenschaften; 3. bearbeitete Auflage (1991).
- Beenackers, J., Kuster, B. F. M. und Vanderbaan, H. S. "Ionization and solvation of D-Glucose." *Carbohydrate Research* (1985) 140 (2): 169-183.
- Bell, A. F., Stoner-Ma, D., Wachter, R. M. und Tonge, P. J. "Light-driven decarboxylation of wild-type green fluorescent protein." *Journal of the American Chemical Society* (2003) 125 (23): 6919-6926.

Biologie-Lexikon <http://www.biologie-lexikon.de/>, Michael Koops, Zugriffsdatum 10/2013.

Blethen, S. L., Boeker, E. A. und Snell, E. E. "Arginine Decarboxylase from *Escherichia Coli* .I. Purification and Specifity for Substrates and Coenzyme." *Journal of Biological Chemistry* (1968) 243 (8): 1671-1677.

Bort, G., Gallavardin, T., Ogden, D. und Dalko, P. I. "From One-Photon to Two-Photon Probes: "Caged" Compounds, Actuators, and Photoswitches." *Angewandte Chemie-International Edition* (2013) 52 (17): 4526-4537.

Bowers, E. M., Ragland, L. O. und Byers, L. D. "Salt effects on beta-glucosidase: pH-profile narrowing." *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* (2007) 1774 (12): 1500-1507.

Brandenberger, H. und Hanson, R. "Eine Spektrophotometrische Bestimmungsmethode für Saure und Alkalische Phosphatasen." *Helvetica Chimica Acta* (1953) 36 (4): 900-906.

Bull, H., Murray, P. G., Thomas, D., Fraser, A. M. und Nelson, P. N. "Acid phosphatases." *Molecular Pathology* (2002) 55 (2): 65-72.

Callaway, E. M. und Yuste, R. "Stimulating neurons with light." *Current Opinion in Neurobiology* (2002) 12 (5): 587-592.

Callender, R. und Dyer, R. B. "Advances in time-resolved approaches to characterize the dynamical nature of enzymatic catalysis." *Chemical Reviews* (2006) 106 (8): 3031-3042.

Carbone, M., Zlateva, T. und Quaroni, L. "Monitoring and manipulation of the pH of single cells using infrared spectromicroscopy and a molecular switch." *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* (2013) 1830 (4): 2989-2993.

Causgrove, T. P. und Dyer, R. B. "Nonequilibrium protein folding dynamics: laser-induced pH-jump studies of the-helix-coil transition." *Chemical Physics* (2006) 323 (1): 2-10.

Chan, C. K., Hu, Y., Takahashi, S., Rousseau, D. L., Eaton, W. A. und Hofrichter, J. "Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1997) 94 (5): 1779-1784.

Chang, C. Y., Fernandez, T., Panchal, R. und Bayley, H. "Caged catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase." *Journal of the American Chemical Society* (1998) 120 (30): 7661-7662.

Chattoraj, M., King, B. A., Bublitz, G. U. und Boxer, S. G. "Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1996) 93 (16): 8362-8367.

Cho, S. S., Ed. "Complex Carbohydrates in Foods (Food Science and Technology)", CRC Press; 1. Auflage (1999).

Ciamician, G. und Silber, P. "Chemical light properties. [Second announcement.]" *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* (1901) 34: 2040-2046.

Cohen, B., Martin Alvarez, C., Alarcos Carmona, N., Angel Organero, J. und Douhal, A. "Proton-Transfer Reaction Dynamics within the Human Serum Albumin Protein." *Journal of Physical Chemistry B* (2011) 115 (23): 7637-7647.

Deng, H., Zhadin, N. und Callender, R. "Dynamics of protein ligand binding on multiple time scales: NADH binding to lactate dehydrogenase." *Biochemistry* (2001) 40 (13): 3767-3773.

Deng, H., Brewer, S., Vu, D. M., Clinch, K., Callender, R. und Dyer, R. B. "On the pathway of forming enzymatically productive ligand-protein complexes in lactate dehydrogenase." *Biophysical Journal* (2008) 95 (2): 804-813.

Diaspro, A., Federici, F., Viappiani, C., Krol, S., Pisciotta, M., Chirico, G., Cannone, F. und Gliozzi, A. "Two-photon photolysis of 2-nitrobenzaldehyde monitored by fluorescent-labeled nanocapsules." *Journal of Physical Chemistry B* (2003) 107 (40): 11008-11012.

Dixon, H. B. F. "Enzyme Nomenclature 1984." *Bioessays* (1985) 2 (1): 41-41.

Dodt, H. U., Eder, M., Frick, A. und Zieglgansberger, W. "Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation." *Science* (1999) 286 (5437): 110-113.

Dommaschke, D. "Beiträge zur Untersuchung der Photochemie von Photolabilen Schutzgruppen." *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* (2005) Dissertation.

Donten, M. L. und Hamm, P. "pH-Jump Overshooting." *Journal of Physical Chemistry Letters* (2011) 2 (13): 1607-1611.

Donten, M. L., Hamm, P. und VandeVondele, J. "A Consistent Picture of the Proton Release Mechanism of oNBA in Water by Ultrafast Spectroscopy and Ab Initio Molecular Dynamics." *Journal of Physical Chemistry B* (2011) 115 (5): 1075-1083.

Duff, S. M. G., Sarath, G. und Plaxton, W. C. "The Role of Acid-Phosphatases in Plant Phosphorus-Metabolism." *Physiologia Plantarum* (1994) 90 (4): 791-800.

Durin, G., Delaunay, A., Darnault, C., Heyes, D. J., Royant, A., Vernede, X., Hunter, C. N., Weik, M. und Bourgeois, D. "Simultaneous Measurements of Solvent Dynamics and Functional Kinetics in a Light-Activated Enzyme." *Biophysical Journal* (2009) 96 (5): 1902-1910.

Eisenmesser, E. Z., Bosco, D. A., Akke, M. und Kern, D. "Enzyme Dynamics During Catalysis." *Science* (2002) 295 (5559): 1520-1523.

Enzymdatenbank Brenda <http://www.brenda-enzymes.org/>, Schomburg, I. et al., Zugriffsdatum 08/2013.

Eyring, H. "The activated complex in chemical reactions." *Journal of Chemical Physics* (1935) 3 (2): 107-115.

Faro, A. R., Adam, V., Carpentier, P., Darnault, C., Bourgeois, D. und de Rosny, E. "Low-temperature switching by photoinduced protonation in photochromic fluorescent proteins." *Photochemical & Photobiological Sciences* (2010) 9 (2): 254-262.

Feitelson J., Hayon, E. und Treinin, A. "Photoionization of Phenols in Water-Effects of Light Intensity, Oxygen, pH, and Temperature." *Journal of the American Chemical Society* (1973) 95 (4): 1025-1029.

Fersht, A. "Structure and Mechanism in Protein Science: a guide to enzyme catalysis and protein folding" New York, *W. H. Freeman and Company* (1999).

Filby, W. G. und Gunther, K. "Photoreactive State in ortho-Nitrobenzaldehyde Rearrangement." *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Frankfurt* (1975) 95 (4-6): 289-292.

Galbavy, E. S., Ram, K. und Anastasio, C. "2-Nitrobenzaldehyde as a chemical actinometer for solution and ice photochemistry." *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* (2010) 209 (2-3): 186-192.

Gellatly, K. S., Moorhead, G. B. G., Duff, S. M. G., Lefebvre, D. D. und Plaxton, W. C. "Purification and Characterization of a Potato Tuber Acid Phosphatase Having Significant Phosphotyrosine Phosphatase Activity." *Plant Physiology* (1994) 106 (1): 223-232.

George, M. V. und Scaiano, J. C. "Photochemistry of Ortho-Nitrobenzaldehyde and Related Studies." *Journal of Physical Chemistry* (1980) 84 (5): 492-495.

Givens, R. S., Stensrud, K., Conrad, P. G., II, Yousef, A. L., Perera, C., Senadheera, S. N., Heger, D. und Wirz, J. "p-Hydroxyphenacyl photoremovable protecting groups - Robust photochemistry despite substituent diversity." *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* (2011) 89 (3): 364-384.

Gohlke, H. und Klebe, G. "Ansätze zur Beschreibung und Vorhersage der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren." *Angewandte Chemie* (2002) 114 (15): 2764-2798.

Gorostiza, P. und Isacoff, E. Y. "Optical switches for remote and noninvasive control of cell signaling." *Science* (2008) 322 (5900): 395-399.

Gundlach, G. und Luttermannsemmer, E. "The Effect of pH and Temperature on the Stability and Enzymatic Activity of Prostatic Acid Phosphatase-Studies on the Optimization of a Continuous Monitored Determination of Acid Phosphatase, II." *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* (1987) 25 (7): 441-446.

Guo, P., Yan, S., Zhou, Y., Wang, C., Xu, X., Weng, X. und Zhou, X. "A novel fluorescent "Turn-Off/Turn-On" system for the detection of acid phosphatase activity." *Analyst* (2013) 138 (12): 3365-3367.

Gutfreund, H. "Kinetics for the Life Sciences: Receptors, Transmitters and Catalysts" Cambridge, *Cambridge University Press* (1995).

Gutman, M. und Huppert, D. "Rapid pH and  $\Delta\mu\text{H}^+$  Jump by short Laser-Pulse." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (1979) 1 (1): 9-19.

Hammes-Schiffer, S. und Benkovic, S. J. "Relating protein motion to catalysis." *Annual Review of Biochemistry* (2006) 75: 519-541.



Hanf, R., Fey, S., Dietzek, B., Schmitt, M., Reinbothe, C., Reinbothe, S., Hermann, G. und Popp, J. "Protein-Induced Excited-State Dynamics of Protochlorophyllide." *Journal of Physical Chemistry A* (2011) 115 (27): 7873-7881.

Heinz, B., Schmierer, T., Laimgruber, S. und Gilch, P. "Excited state processes of nitrobenzaldehydes probed by ultrafast fluorescence and absorption spectroscopy." *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* (2008) 199 (2-3): 274-281.

Hesse M., Meier H. und Zehe, B. "Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie", 7. überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart (2005).

Hickey, M. E., Waymack, P. P. und van Etten, R. L. "pH-Dependent Leaving Group Effects on Hydrolysis Reactions of Phosphate and Phosphonate Esters Catalyzed by Wheat Germ Acid Phosphatase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1976) 172 (2): 439-448.

Höhne, M. "Synthese und Charakterisierung photoaktivierbarer Verbindungen." *Universität Rostock* (2012) Bachelorarbeit.

Horton H. R. , L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry und J. D. Rawn "Biochemie", 4. überarbeitete Auflage, Pearson Deutschland GmbH (2008).

Janko, K. und Reichert, J. "Proton Concentration Jumps and Generation of Transmembrane pH-gradient by Photolysis of 4-Formyl-6-methoxy-3-nitrophenoxyacetic acid." *Biochimica Et Biophysica Acta* (1987) 905 (2): 409-416.

Jeong, G. S., Chung, S., Kim, C. B. und Lee, S. H. "Applications of micromixing technology." *Analyst* (2010) 135 (3): 460-473.

Joshi, H. C., Gooijer, C. und van der Zwan, G. "Water-induced quenching of salicylic anion fluorescence." *Journal of Physical Chemistry A* (2002) 106 (47): 11422-11430.

Joshi, H. C., Gooijer, C. und van der Zwan, G. "Substitution effects on the photophysical characteristics of the salicylic anion." *Journal of Fluorescence* (2003) 13 (3): 227-234.

Juhl, B. und Pleiss, J. "Molekulares Docking von Substraten und Enzymen." *BIOspektrum* (2009) 07: 765.

Kalyanaraman, B., Ramanujam, S., Singh, R. J., Joseph, J. und Feix, J. B. "Formation of 2,5-dihydroxybenzoic acid during the reaction between singlet oxygen ( $^1O_2$ ) and salicylic acid: analysis by ESR oximetry and HPLC with electrochemical detection." *Journal of the American Chemical Society* (1993) 115 (10): 4007-4012.

Kamada, K., Nakamura, T. und Tsukahara, S. "Photoswitching of Enzyme Activity of Horseradish Peroxidase Intercalated into Semiconducting Layers." *Chemistry of Materials* (2011) 23 (11): 2968-2972.

Kandler, K., Katz, L. C. und Kauer, J. A. "Focal photolysis of caged glutamate produces long-term depression of hippocampal glutamate receptors." *Nature Neuroscience* (1998) 1 (2): 119-123.

Kao, Y. T., Saxena, C., Wang, L. J., Sancar, A. und Zhong, D. P. "Femtochemistry in enzyme catalysis: DNA photolyase." *Cell Biochemistry and Biophysics* (2007) 48 (1): 32-44.

Kaplan, J. H., Forbush, B. und Hoffman, J. F. "Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analog - Utilization by Na-K Pump of Human Red Blood-Cell Ghosts." *Biochemistry* (1978) 17 (10): 1929-1935.

Karplus, M. "Aspects of protein reaction dynamics: Deviations from simple behavior." *Journal of Physical Chemistry B* (2000) 104 (1): 11-27.

Khan, S., Castellano, F., Spudich, J. L., McCray, J. A., Goody, R. S., Reid, G. P. und Trentham, D. R. "Excitatory Signaling in Bacteria Probed by Caged Chemoeffectors." *Biophysical Journal* (1993) 65 (6): 2368-2382.

Kiser, P. D., Golczak, M., Maeda, A. und Palczewski, K. "Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina." *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* (2012) 1821 (1): 137-151.

Klan, P., Pelliccioli, A. P., Pospisil, T. und Wirz, J. "2,5-Dimethylphenacyl esters: A photoremovable protecting group for phosphates and sulfonic acids." *Photochemical & Photobiological Sciences* (2002) 1 (11): 920-923.

Klan, P., Solomek, T., Bochet, C. G., Blanc, A., Givens, R., Rubina, M., Popik, V., Kostikov, A. und Wirz, J. "Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy." *Chemical Reviews* (2013) 113 (1): 119-191.

Klein, D. C. "Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the timezyme"." *Journal of Biological Chemistry* (2007) 282 (7): 4233-4237.

Klonis, N. und Sawyer, W. H. "Spectral Properties of the Prototropic Forms of Fluorescein in Aqueous Solution." *Journal of Fluorescence* (1996) 6 (3): 147-157.

Kohse, S., Neubauer, A., Pazidis, A., Lochbrunner, S. und Kragl, U. "Photoswitching of Enzyme Activity by Laser-Induced pH-Jump." *Journal of the American Chemical Society* (2013) 135 (25): 9407-9411.

Kruzel, M. und Morawiecka, B. "Acid-Phosphatase of Potato-Tubers (*Solanum-Tuberosum*-L) - Purification, Properties, Sugar and Amino-Acid-Composition." *Acta Biochimica Polonica* (1982) 29 (3-4): 321-330.

Kuberski, S. und Gebicki, J. "Evidence for a Ketene Intermediate in the Photochemical Transformation of Matrix-Isolated o-Nitrobenzaldehyde." *Journal of Molecular Structure* (1992) 275: 105-110.

Kubicz, A. "Acid Phosphatase III from Potatoe Tubers, Molecular Weight ans Subunit Structure." *Acta Biochimica Polonica* (1973) 20 (3): 223 - 229.

Kubicz, A., Morawiec, B. und Kruzel, M. "Heterogenity of Acid-Phosphatase from Potato-Tubers." *Acta Biochimica Polonica* (1974) 21 (2): 113-117.

Kuhn, H. J., Braslavsky, S. E. und Schmidt, R. "Chemical actinometry." *Pure and Applied Chemistry* (2004) 76 (12): 2105-2146.

- Laimgruber, S., Schreier, W. J., Schrader, T., Koller, F., Zinth, W. und Gilch, P. "The photochemistry of o-nitrobenzaldehyde as seen by femtosecond vibrational spectroscopy." *Angewandte Chemie-International Edition* (2005) 44 (48): 7901-7904.
- Laimgruber, S., Schmierer, T., Gilch, P., Kiewisch, K. und Neugebauer, J. "The ketene intermediate in the photochemistry of ortho-nitrobenzaldehyde." *Physical Chemistry Chemical Physics* (2008) 10 (26): 3872-3882.
- Langhojer, F., Dimler, F., Jung, G. und Brixner, T. "Ultrafast Photoconversion of the Green Fluorescent Protein Studied by Accumulative Femtosecond Spectroscopy." *Biophysical Journal* (2009) 96 (7): 2763-2770.
- Latzko, E. "Enzymatische Katalyse und Mineralstoffwirkung." *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* (1967) 117 (3): 179-193.
- Lee, H. M., Larson, D. R. und Lawrence, D. S. "Illuminating the Chemistry of Life: Design, Synthesis, and Applications of "Caged" and Related Photoresponsive Compounds." *American Chemical Society Chemical Biology* (2009) 4 (6): 409-427.
- Lewis, F. D., Sinks, L. E., Weigel, W., Sajimon, M. C. und Crompton, E. M. "Ultrafast proton transfer dynamics of hydroxystilbene photoacids." *Journal of Physical Chemistry A* (2005) 109 (11): 2443-2451.
- Leyva, V., Corral, I., Schmierer, T., Heinz, B., Feixas, F., Migani, A., Blancafort, L., Gilch, P. und Gonzalez, L. "Electronic states of o-nitrobenzaldehyde: A combined experimental and theoretical study." *Journal of Physical Chemistry A* (2008) 112 (23): 5046-5053.
- Lienhard, G. E. "Enzymatic Catalysis and Transition-State Theory." *Science* (1973) 180 (4082): 149-154.
- Lucas, J. A. und Pitt, D. "Seasonal Changes in Molecular Forms of Acid Phosphatase and Ribonuclease of Potato Tubers and the Effects of Infection by *Phytophthora erythroseptica*." *Annals of Botany* (1975) 39 (163): 935-945.
- Ma, C., Kwok, W. M., Chan, W. S., Du, Y., Zuo, P., Kan, J. T. W., Toy, P. H. und Phillips, D. L. "Time-resolved spectroscopy studies of the photodeprotection reactions of p-hydroxyphenacyl ester phototrigger compounds." *Current Science* (2009) 97 (2): 202-209.
- Malenka, R. C. "Synaptic Plasticity in the Hippocampus: LTP and LTD." *Cell* (1994) 78: 535-536.
- Mandal, P., Eremina, N. und Barth, A. "Formation of Two Different Types of Oligomers in the Early Phase of pH-Induced Aggregation of the Alzheimer A beta(12-28) Peptide." *Journal of Physical Chemistry B* (2012) 116 (41): 12389-12397.
- Marantz, Y., Einarsdottir, O., Nachliel, E. und Gutman, M. "Proton-collecting properties of bovine heart cytochrome c oxidase: Kinetic and electrostatic analysis." *Biochemistry* (2001) 40 (50): 15086-15097.
- Marion, G. M. und Babcock, K. L. "Predicting specific conductance and salt concentration in dilute aqueous solutions." *Soil Science* (1976) 122 (4): 181-187.

Marzadori, C., Gessa, C. und Ciurli, S. "Kinetic properties and stability of potato acid phosphatase immobilized on Ca-polygalacturonate." *Biology and Fertility of Soils* (1998) 27: 97–103.

Mayer, G. und Heckel, A. "Biologically active molecules with a "light switch"." *Angewandte Chemie-International Edition* (2006) 45 (30): 4900-4921.

McClendon, S., Zhadin, N. und Callender, R. "The approach to the Michaelis complex in lactate dehydrogenase: The substrate binding pathway." *Biophysical Journal* (2005) 89 (3): 2024-2032.

Meech, S. R. und Phillips, D. "Photophysics of some common fluorescence standards." *Journal of Photochemistry* (1983) 23 (3): 193-217.

Meech, S. R. "Excited state reactions in fluorescent proteins." *Chemical Society Reviews* (2009) 38 (10): 2922-2934.

Miksovská, J. und Larsen, R. W. "Photothermal studies of pH induced unfolding of apomyoglobin." *Journal of Protein Chemistry* (2003) 22 (4): 387-394.

Mittal, L. J., Mittal, J. P. und Hayon, E. "Primary processes in the photochemistry of phenylalanine and derivatives in aqueous solution. Biphotonic photoionization and photodissociation reactions." *Journal of the American Chemical Society* (1973) 95 (19): 6203-6210.

Nag, S., Bandyopadhyay, A. und Maiti, S. "Spatial pH Jump Measures Chemical Kinetics in a Steady-State System." *Journal of Physical Chemistry A* (2009) 113 (18): 5269-5272.

Nakano, H., Tamai, N., Nii, M., Tsukamoto, M. und Abe, N. "Change in the UV-VIS Absorbance of Amino Acids as a Result of Femtosecond Laser Irradiation." *Journal of Laser Micro Nanoengineering* (2007) 2 (1): 100-102.

Ngoy, B. P., Sebej, P., Solomek, T., Lim, B. H., Pastierik, T., Park, B. S., Givens, R. S., Heger, D. und Klan, P. "2-Hydroxyphenacyl ester: a new photoremovable protecting group." *Photochemical & Photobiological Sciences* (2012) 11 (9): 1465-1475.

Nunes, R. M. D., Pineiro, M. und Arnaut, L. G. "Photoacid for Extremely Long-Lived and Reversible pH-Jumps." *Journal of the American Chemical Society* (2009) 131 (26): 9456-9462.

Okafuji, A., Biskup, T., Hitomi, K., Getzoff, E. D., Kaiser, G., Batschauer, A., Bacher, A., Hidema, J., Teranishi, M., Yamamoto, K., Schleicher, E. und Weber, S. "Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases." *DNA Repair* (2010) 9 (5): 495-505.

Olczak, M., Morawiecka, B. und Watorek, W. "Plant purple acid phosphatases - genes, structures and biological function." *Acta Biochimica Polonica* (2003) 50 (4): 1245-1256.

Olson, J. M. und Blankenship, R. E. "Thinking about the evolution of photosynthesis." *Photosynthesis Research* (2004) 80 (1-3): 373-386.

Olsson, M. H. M., Parson, W. W. und Warshel, A. "Dynamical contributions to enzyme catalysis: Critical tests of a popular hypothesis." *Chemical Reviews* (2006) 106 (5): 1737-1756.

- Pelliccioli, A. P. und Wirz, J. "Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications." *Photochemical & Photobiological Sciences* (2002) 1 (7): 441-458.
- Peralvarez-Marin, A., Barth, A. und Graslund, A. "Time-resolved infrared spectroscopy of pH-induced aggregation of the Alzheimer A beta(1-28) peptide." *Journal of Molecular Biology* (2008) 379 (3): 589-596.
- Perkampus, H.-H. und Kaufmann, R. "Kinetische Analyse mit Hilfe der UV-VIS-Spektrometrie" Weinheim, *Wiley-VCH Verlag* (1991).
- Pozdnyakov, I. P., Sosedova, Y. A., Plyusnin, V. F., Grivin, V. P. und Bazhin, N. M. "Photochemistry of salicylate anion in aqueous solution." *Russian Chemical Bulletin* (2007) 56 (7): 1318-1324.
- Pozdnyakov, I. P., Pigliucci, A., Tkachenko, N., Plyusnin, V. F., Vauthey, E. und Lemmetyinen, H. "The photophysics of salicylic acid derivatives in aqueous solution." *Journal of Physical Organic Chemistry* (2009) 22 (5): 449-454.
- Qiu, L., Gulotta, M. und Callender, R. "Lactate dehydrogenase undergoes a substantial structural change to bind its substrate." *Biophysical Journal* (2007) 93 (5): 1677-1686.
- Radzicka, A. und Wolfenden, R. "A Proficient Enzyme." *Science* (1995) 267 (5194): 90-93.
- Rane, S. Y., Badave, K. D. und Ahmed, K. "Insight into bio-physiological functions of acid phosphatase from potatoes (*Solanum tuberosum*): A bioanalytical approach." *Indian Journal of Chemistry Section a-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry* (2009) 48 (1): 15-24.
- Riedle, E., Beutter, M., Lochbrunner, S., Piel, J., Schenkl, S., Spörlein, S. und Zinth, W. "Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR." *Applied Physics B* (2000) 71 (3): 457-465.
- Rigden, D. J. "The histidine phosphatase superfamily: structure and function." *Biochemical Journal* (2008) 409: 333-348.
- Rini, M., Magnes, B. Z., Pines, E. und Nibbering, E. T. J. "Real-time observation of bimodal proton transfer in acid-base pairs in water." *Science* (2003) 301 (5631): 349-352.
- Rosell, F. I. und Mauk, A. G. "Photochemical reagents for the study of metalloproteins by flash photolysis." *Coordination Chemistry Reviews* (2011) 255 (7-8): 737-756.
- Rozzell, J. D. "Commercial scale biocatalysis: Myths and realities." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999) 7 (10): 2253-2261.
- Saeidian, S. "Demonstration and Modification of the pH Profile of Polyphenol Oxidase in *Solanum Lycopersicum*." *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* (2012) 2 (6): 385-388.
- Sahu, K., Roy, D., Mondal, S. K., Karmakar, R. und Bhattacharyya, K. "Study of protein-surfactant interaction using excited state proton transfer." *Chemical Physics Letters* (2005) 404 (4-6): 341-345.

- Salinas, F., Delapena, A. M., Duranmeras, I. und Duran, M. S. "Determination of Salicylic-Acid and Its Metabolites in Urine by Derivative Synchronous Spectrofluorimetry." *Analyst* (1990) 115 (7): 1007-1011.
- Saxena, A. M., Udgaonkar, J. B. und Krishnamoorthy, G. "Protein dynamics control proton transfer from bulk solvent to protein interior: A case study with a green fluorescent protein." *Protein Science* (2005) 14 (7): 1787-1799.
- Schaper, K. "NMR-spectroscopic investigation of o-nitrosobenzoic acid." *Magnetic Resonance in Chemistry* (2008) 46 (12): 1163-1167.
- Schätzler, B., Dencher, N. A., Tittor, J., Oesterheld, D., Yaniv-Checover, S., Nachliel, E. und Gutman, M. "Subsecond proton-hole propagation in bacteriorhodopsin." *Biophysical Journal* (2003) 84 (1): 671-686.
- Scheck, C. K. und Frimmel, F. H. "Degradation of phenol and salicylic acid by ultraviolet radiation/hydrogen peroxide/oxygen." *Water Research* (1995) 29 (10): 2346-2352.
- Schenk, G., Elliott, T. W., Leung, E., Carrington, L. E., Mitic, N., Gahan, L. R. und Guddat, L. W. "Crystal structures of a purple acid phosphatase, representing different steps of this enzyme's catalytic cycle." *Bmc Structural Biology* (2008) 8.
- Schenk, G., Mitic, N., Hanson, G. R. und Comba, P. "Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme." *Coordination Chemistry Reviews* (2013) 257 (2): 473-482.
- Schoemaker, H. E., Mink, D. und Wubbolts, M. G. "Dispelling the myths - Biocatalysis in industrial synthesis." *Science* (2003) 299 (5613): 1694-1697.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Sohngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M. und Schomburg, D. "BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA." *Nucleic Acids Research* (2013) 41 (D1): D764-D772.
- Schramm, V. L. "Enzymatic transition states and transition state analog design." *Annual Review of Biochemistry* (1998) 67: 693-720.
- Schramm, V. L. "Enzymatic Transition States, Transition-State Analogs, Dynamics, Thermodynamics, and Lifetimes". Annual Review of Biochemistry, Vol 80. R. D. Kornberg, C. R. H. Raetz, J. E. Rothman und J. W. Thorner. Palo Alto, *Annual Reviews* (2011) 80: 703-732.
- Segel, I. H. "Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems" New York, *John Wiley & Sons, Inc.*, 15. Druck (1993).
- Shi, Z., Peng, P., Strohecker, D. und Liao, Y. "Long-Lived Photoacid Based upon a Photochromic Reaction." *Journal of the American Chemical Society* (2011) 133 (37): 14699-14703.
- Sigma-Aldrich "Acid Phosphatase from potato." *product information* (2012).
- Solymosi, K., Smeller, L., Ryberg, M., Sundqvist, C., Fidy, J. und Boddi, B. "Molecular rearrangement in POR macrodomains as a reason for the blue shift of chlorophyllide fluorescence observed after phototransformation." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* (2007) 1768 (6): 1650-1658.

Specht, A., Bolze, F., Omran, Z., Nicoud, J. F. und Goeldner, M. "Photochemical tools to study dynamic biological processes." *Human Frontier Science Program Journal* (2009) 3 (4): 255-264.

Stryer L., Berg J. M. und Tymoczko J. L. "Biochemistry" New York, 5th edition, *W. H. Freeman and Company* (2002).

Swietach, P., Spitzer, K. W. und Vaughan-Jones, R. D. "pH-dependence of extrinsic and intrinsic H<sup>+</sup>-ion mobility in the rat ventricular myocyte, investigated using flash photolysis of a caged-H<sup>+</sup> compound." *Biophysical Journal* (2007) 92 (2): 641-653.

Sytina, O. A., Heyes, D. J., Hunter, C. N., Alexandre, M. T., van Stokkum, I. H. M., van Grondelle, R. und Groot, M. L. "Conformational changes in an ultrafast light-driven enzyme determine catalytic activity." *Nature* (2008) 456 (7224): 1001-1004.

Sytina, O. A., Alexandre, M. T., Heyes, D. J., Hunter, C. N., Robert, B., Grondelle, R. v. und Groot, M. L. "Enzyme activation and catalysis: characterisation of the vibrational modes of substrate and product in protochlorophyllide oxidoreductase." *Physical Chemistry Chemical Physics* (2011) 13 (6): 2307-2313.

Sytina, O. A., van Stokkum, I. H. M., Heyes, D. J., Hunter, C. N. und Groot, M. L. "Spectroscopic characterization of the first ultrafast catalytic intermediate in protochlorophyllide oxidoreductase." *Physical Chemistry Chemical Physics* (2012) 14 (2): 616-625.

Tanemura, Y. und Yoshino, M. "Regulatory role of polyamine in the acid phosphatase from potato tubers." *Plant Physiology and Biochemistry* (2006) 44 (1): 43-48.

Tolbert, L. M. und Solntsev, K. M. "Excited-state proton transfer: From constrained systems to "super" photoacids to superfast proton transfer." *Accounts of Chemical Research* (2002) 35 (1): 19-27.

van Thor, J. J. "Photoreactions and dynamics of the green fluorescent protein." *Chemical Society Reviews* (2009) 38 (10): 2935-2950.

Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L. und Laskin, J. D. "Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase." *Journal of Biological Chemistry* (2005) 280 (42): 35372-35381.

Viappiani, C., Abbruzzetti, S., Small, J. R., Libertini, L. J. und Small, E. W. "An experimental methodology for measuring volume changes in proton transfer reactions in aqueous solutions." *Biophysical Chemistry* (1998a) 73 (1-2): 13-22.

Viappiani, C., Bonetti, G., Carcelli, M., Ferrari, F. und Sternieri, A. "Study of proton transfer processes in solution using the laser induced pH-jump: A new experimental setup and an improved data analysis based on genetic algorithms." *Review of Scientific Instruments* (1998b) 69 (1): 270-276.

Villali, J. und Kern, D. "Choreographing an enzyme's dance." *Current Opinion in Chemical Biology* (2010) 14 (5): 636-643.

Wald, G. "The Molecular Basis of Visual Excitation." *Nature* (1968) 219 (5156): 800-807.

Wang, D.-Y., Lian, Y. und Zhu, D.-W. "Acid phosphatase activity may affect the tuber swelling by partially regulating sucrose-mediated sugar resorption in potato." *Journal of Integrative Plant Biology* (2008) 50 (6): 733-741.

Wilhelm, T., Piel, J. und Riedle, E. "Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter." *Optics Letters* (1997) 22 (19): 1494-1496.

Worthington Enzyme Manual Assay (2013). "<http://www.worthington-biochem.com/AP/assay.html>." Zugriffsdatum 01.07.2013.

Wraight, C. A. "Chance and design - Proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (2006) 1757 (8): 886-912.

Yang, D., Li, Z., Allan Diwu, Y., Fu, H., Liao, J., Wei, C. und Diwu, Z. "A Novel Fluorogenic Coumarin Substrate for Monitoring Acid Phosphatase Activity at Low pH Environment." *Current Chemical Genomics* (2008) 2: 48-50.

Yip, R. W. und Sharma, D. K. "The Reactive State in the Photo-Rearrangement of Ortho-Nitrobenzaldehyde." *Research on Chemical Intermediates* (1989) 11 (2): 109-116.

Young, D. D. und Deiters, A. "Photochemical control of biological processes." *Organic & Biomolecular Chemistry* (2007) 5 (7): 999-1005.

Yue, X., Yanez, C. O., Yao, S. und Belfield, K. D. "Selective Cell Death by Photochemically Induced pH Imbalance in Cancer Cells." *Journal of the American Chemical Society* (2013) 135 (6): 2112-2115.

Zhang, L., Buchet, R. und Azzar, G. "Phosphate binding in the active site of alkaline phosphatase and the interactions of 2-nitrosoacetophenone with alkaline phosphatase-induced small structural changes." *Biophysical Journal* (2004) 86 (6): 3873-3881.

Zhao, G.-J. und Han, K.-L. "Site-specific solvation of the photoexcited protochlorophyllide a in methanol: Formation of the hydrogen-bonded intermediate state induced by hydrogen-bond strengthening." *Biophysical Journal* (2008) 94 (1): 38-46.

Zhong, D. P. "Ultrafast catalytic processes in enzymes." *Current Opinion in Chemical Biology* (2007) 11 (2): 174-181.

Zou, K. Y., Cheley, S., Givens, R. S. und Bayley, H. "Catalytic subunit of protein kinase A caged at the activating phosphothreonine." *Journal of the American Chemical Society* (2002) 124 (28): 8220-8229.



## 6.2. Chemikalien

**Tabelle 14.** Liste verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Chargennummer	Reinheit [%]
2-Nitrobenzaldehyd	Fluka	138454911809123	≥ 99
4-Bromo-2-Nitrobenzaldehyd	ABCR	1211366	≥ 97
4-Chloro-2-Nitrobenzaldehyd	Sigma-Aldrich	044121435	≥ 99
4-Fluoro-2-Nitrobenzaldehyd	ABCR	1184389	≥ 98
Fluorescein	Sigma-Aldrich		99
Salicylsäure	Merck	2007123(EWG)	≥ 99
2-Carboxyphenylphosphat	Alfa Aesar	10133002	≥ 99
6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferonphosphat	AAT Bioquest	047009, 064052	≥ 99
6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferon	AAT Bioquest	011142, 075036	≥ 98
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	S7BC2210V	≥ 99,8
Ethanol	Merck		≥ 99,9
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich	SZBD0080V	≥ 98
saure Phosphatase (4,1 U/mg)	Sigma-Aldrich	060M7011V	
Chininsulfat Dihydrat	Sigma-Aldrich		≥ 98
Natriumacetat	Sigma Aldrich	BCDH0254V	≥ 99
Essigsäure	J.T. Baker	0301710004	99-100
Maleinsäure	Serva	07731	z. A.
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck	8382A020831	z. A.
Natriumtetraborat Decahydrat	J.T. Baker	M26H06	z. A.
SeeBlue(R) Standard	invitrogen	536030	
Novex(R)-Sharp Unstained Protein Standards	invitrogen	1189842	
NuPAGE(R)-Reduktionsmittel	invitrogen	1366046	
NuPAGE(R)-MES SDS Puffer	invitrogen	1177481	
Simply Blue Safe Stain Lösung	invitrogen	1237898	
NuPAGE(R) 4-12% Bis-Tris-Gel	invitrogen	12101573	
Puffer pH 7 (Präzisions-DIN Puffer)	WTW		
Puffer pH 4 (Präzisions-DIN Puffer)	WTW		
Puffer pH 3 (Fixanal(R))	Riedel-de Haen	907138742	
Puffer pH 1 (Fixanal(R))	Riedel-de Haen	921238740	
Toluol	Chemikalienlager		

## 6.3. Geräte

**Tabelle 15.** Liste verwendeter Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
pH-Messgeräte	WTW pH 340i mit IoLine-Elektrode	WTW Mettler Toledo, SI Analytics GmbH
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Pipette	5000–500 µl	Eppendorf Research
Pipette	1000–100 µl	Eppendorf Research
Pipette	200–20 µl	Eppendorf Research
Pipette	100–10 µl	Eppendorf Research
Kryostat	Compatible Control CC1	Huber
Waage	Satorius BP 121S	Satorius
Waage	Satorius LC 621P	Satorius
Reinstwasser-Anlage	SG Typ Ultraclear	SG
Ionenaustauscher		SG
Absorptionsspektrometer	Specord 50	Analytik Jena
CPA 2001	Ti:Saphir-Verstärkersystem	Clark MXR
SH05	Shutter	Thorlabs
DH-2000-BAL	UV-Vis-Lichtquelle	Ocean Optics
QE 65000	Faserspektrometer	Ocean Optics
DC-Red	Langpassfilter	Linos Photonics
NT 242	Nd-YAG-Lasersystem	EKSPLA
Lasercam HR	Beamkamera	Coherent
DSO6104A	Oszilloskop	Agilent Technologies
Superlite 400	Multispektral Lichtquelle 320-700 nm	Lumatech

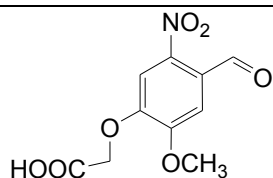
## 6.4. Verbindungsverzeichnis

Die folgende Übersicht enthält die Strukturformeln aller anführten Verbindungen zur Darstellung. Die Verbindungen wurden alphabetisch sortiert.

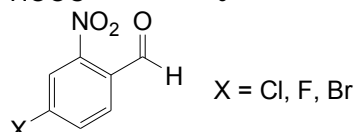
**Tabelle 16.** Strukturformeln aller anführten Verbindungen

Verbindung	Strukturformel
1-(2-Nitrophenyl)ethylsulfat	
2(3 <i>H</i> )-Benzofuranon	
2,5-Dimethylphenacyl-4-toluolsulfonat	
2-Carboxyphenylphosphat	
2-Hydroxyphenylacetat	
2-Hydroxyphenyl-1-(2-nitrophenyl)ethylphosphat	
2-Nitrobenzaldehyd	
2-Nitrosobenzoessäure	
3(2 <i>H</i> )-Benzofuranon	
4-Carboxy-3-nitroso-6-methoxyphenoxyessigsäure	

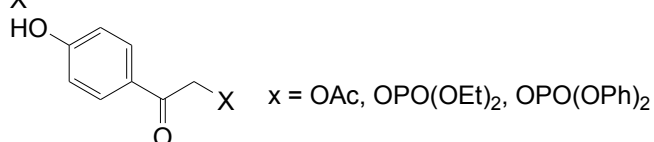
4-Formyl-6-methoxy-3-nitrophenoxyessigsäure



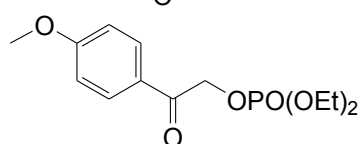
4-Halogen-2-Nitrobenzaldehyd



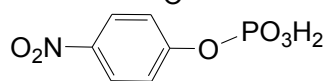
4-Hydroxyphenylacetat,  
4-Hydroxyphenyldiethylphosphat,  
4-Hydroxyphenyldiphenylphosphat,



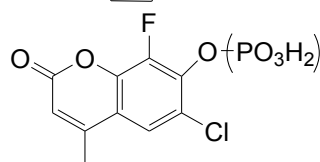
4-Metoxyphenyldiethylphosphat



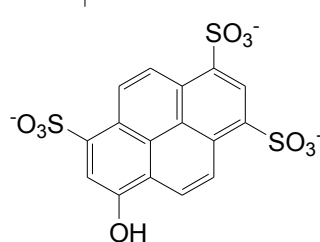
4-Nitrophenylphosphat



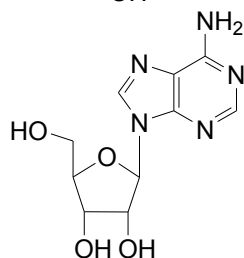
6-Chloro-8-fluoro-4-methylumbelliferon(phosphat)



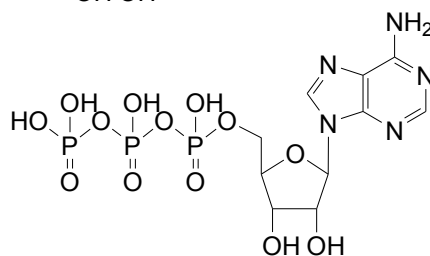
8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonat



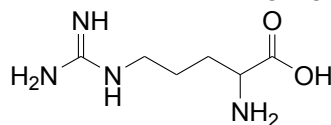
Adenosin



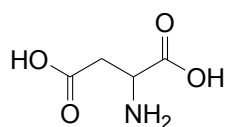
Adenosintriphosphat



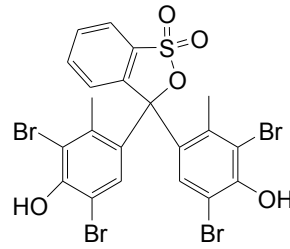
Arginin



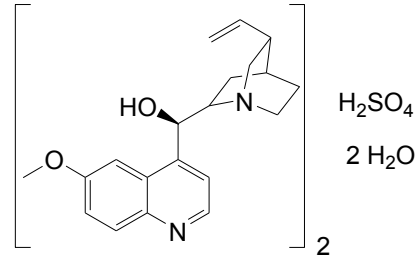
Asparaginsäure



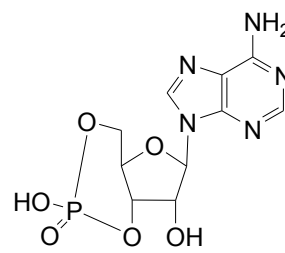
Bromkresolgrün



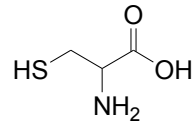
Chininsulfat Dihydrat



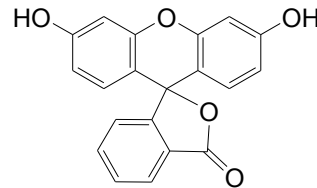
cyclisches Adenosinmonophosphat



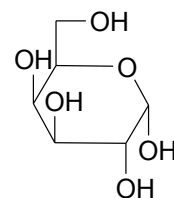
Cystein



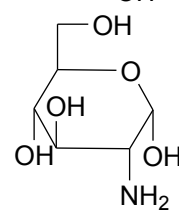
Fluorescein



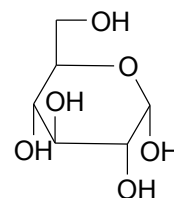
Galactose



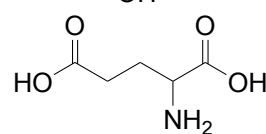
Glucosamin



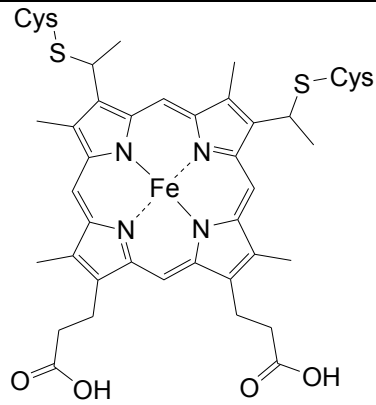
Glucose



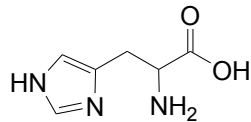
Glutaminsäure



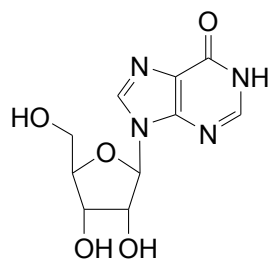
Häm c



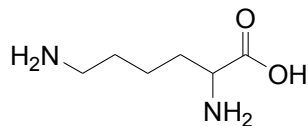
Histidin



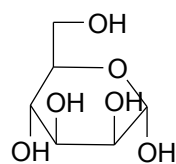
Inosin



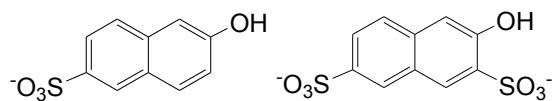
Lysin



Mannose

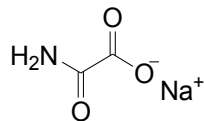


Naphtholsulfonat

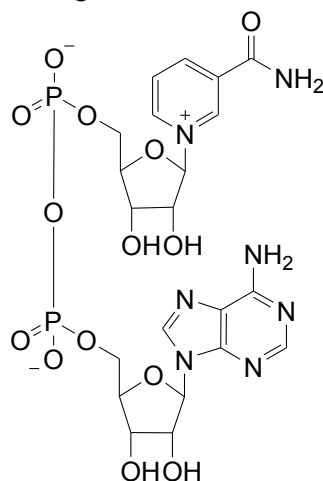


ausgewählte Verbindungen [Gutman und Huppert, 1979]  
entnommen

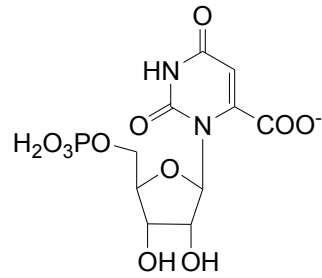
Natriumoxamat



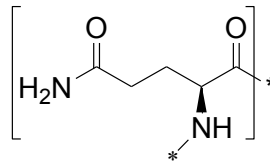
Nicotinamidadenindinukleotid



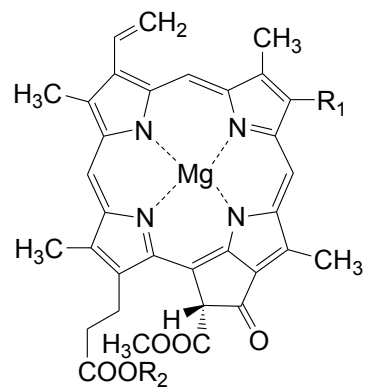
Orotidin-5'-monophosphat



Poly-L-glutamin

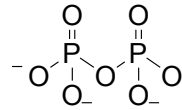


Protochlorophyllid

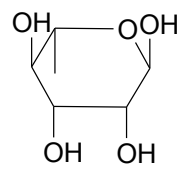


[Sytina *et al.*, 2011]

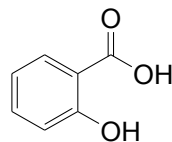
Pyrophosphat



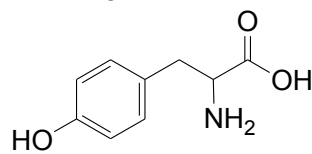
Rhamnose



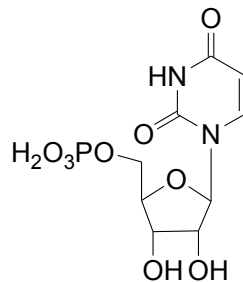
Salicylsäure



Tyrosin



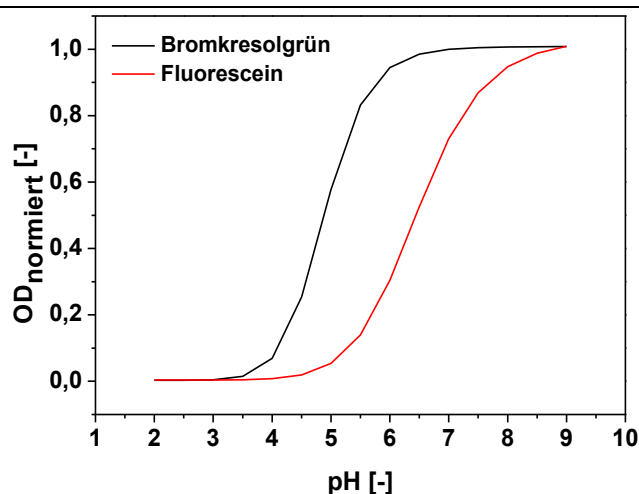
Uridin-5'-monophosphat



## 6.5. Ergänzende experimentelle Daten

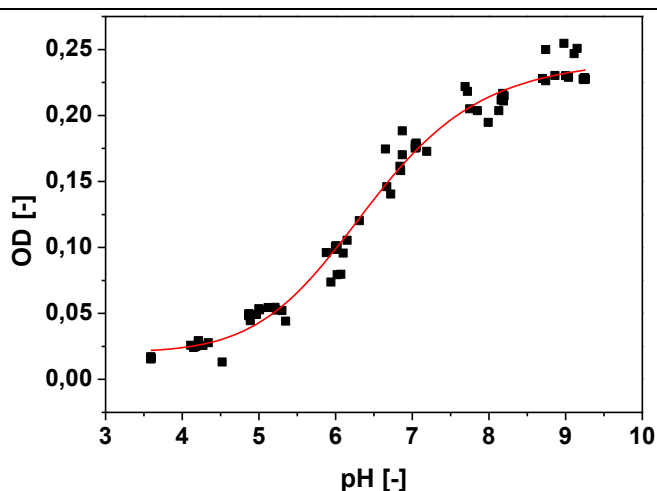
### 6.5.1. Fluorescein als pH-Indikator

In Abschnitt 3.4.2 wurde Fluorescein als Indikator für den pH-Sprung vorgestellt. Die pH-abhängigen Absorptionseigenschaften der prototropen Formen des Fluoresceins führen dazu, dass der Umschlagbereich des Indikators gegenüber gebräuchlichen pH-Indikatoren deutlich aufgeweitet ist. Dies wird in Abbildung 63 vergleichend für das verwendete Fluorescein und Bromkresolgrün dargestellt.



**Abbildung 63.** Absorptionsverhalten des Fluorescein bei 490 nm und Bromkresolgrün bei 615 nm in Abhängigkeit des pH-Wertes im Vergleich (3  $\mu$ M Fluorescein in wässriger Lösung mit 0,1 % Ethanol; 10  $\mu$ M Bromkresolgrün in wässriger Lösung; pH-Werte wurden mit NaOH und HCl eingestellt)

Für die Datenauswertung wurde eine Kalibrierfunktion  $OD(pH)$  über insgesamt 8 Messreihen erstellt.

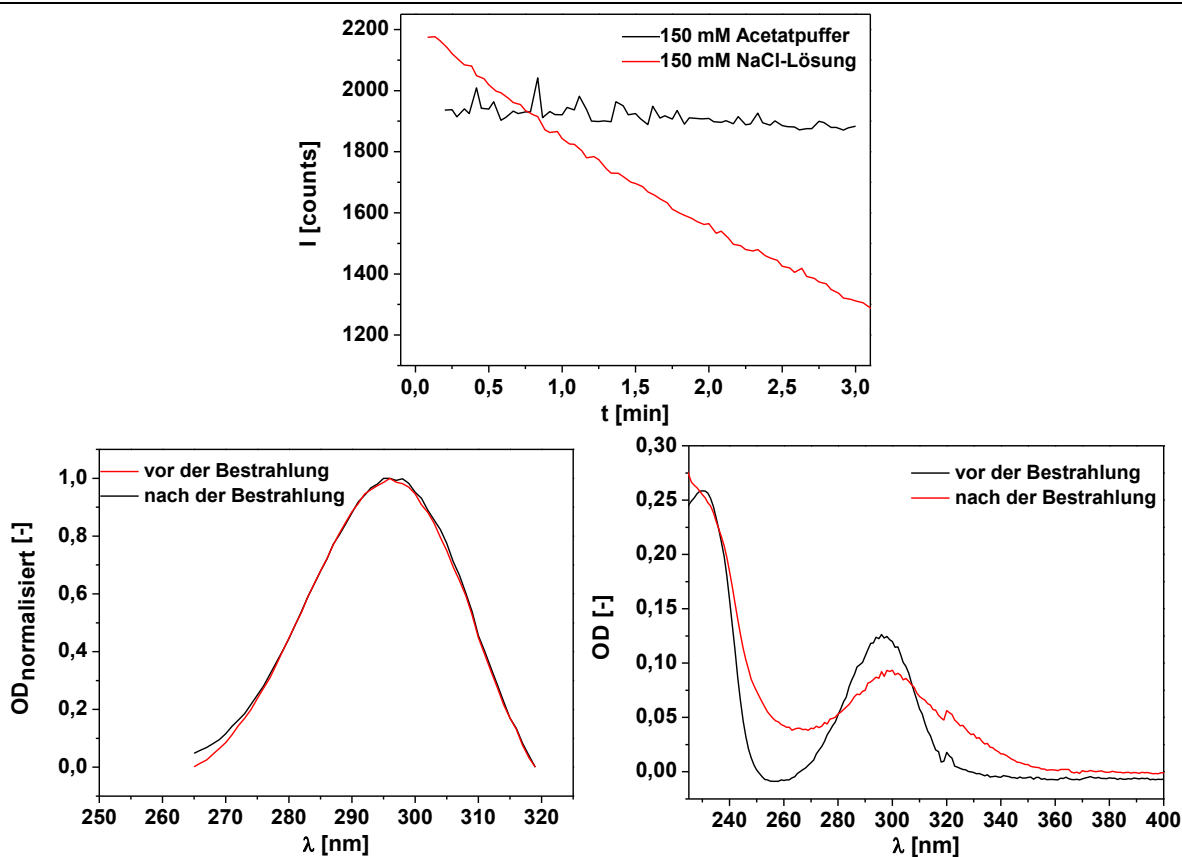


**Abbildung 64.** Kalibrierung der 3  $\mu$ M Fluoresceinlösung (wässrig mit 0,1 % EtOH; pH 4-9 eingestellt mit NaOH und HCl; Auswertung bei 490 nm; Messwerte aus 8 Messreihen; gefittete Funktion = Hill-Fkt.)



### 6.5.2. Zersetzung der Salicylsäure

In Abschnitt 4.2.1 wurde diskutiert, dass bei Anregung der Fluoreszenz der Salicylsäure eine scheinbare Zersetzung auftritt. Im oberen Graph der Abbildung 65 wird dargestellt, dass in der zeitlichen Verfolgung ein sinkendes Fluoreszenzsignal der Salicylsäure zu verzeichnen ist. Dabei existiert ein Unterschied im Rückgang des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit des Mediums. Während in Acetatpuffer lediglich ein geringfügiger Rückgang der Fluoreszenz zu beobachten ist, fällt das Fluoreszenzsignal in NaCl-Lösung signifikant. Weiterhin wurden Absorptionsspektren vor und nach der Bestrahlung aufgenommen. Auch hier ist der Unterschied des Verhaltens deutlich zu erkennen. Während die normierten Spektren in gepufferter Lösung (Abbildung 65, links unten) nahezu identisch sind, weisen die Spektren in NaCl-Lösung (Abbildung 65, rechts unten) erhebliche Veränderungen der Absorptionseigenschaften auf. Dies deutet auf eine Zersetzung der Salicylsäure während der Fluoreszenzanregung in NaCl-Lösung hin.



**Abbildung 65.** Zersetzung der Salicylsäure unter UV-Anregung (oben: Signal der Fluoreszenzintensität; 50  $\mu$ M Salicylsäure in 150 mM Acetatpuffer pH 5,5 und 150 mM NaCl-Lösung;  $\lambda_{\text{exc}}$  = 265 nm;  $P$  = 350  $\mu$ W; unten: Absorptionsspektren vor und nach der Anregung links: 50  $\mu$ M Salicylsäure in 150 mM Acetatpuffer pH 5,5; normiert; rechts: 40  $\mu$ M Salicylsäure in 150 mM NaCl-Lsg. pH 5,5)

### 6.5.3. Durchführung der Gelelektrophorese

Zur Molmassen- und Reinheitsbestimmung des verwendeten Enzyms wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei erfolgt die räumliche Auftrennung der Proteine durch ihre unterschiedliche Mobilität entlang eines Gradienten im elektrischen Feld. In Relation zu kommerziell erhältlichen Standards kann dann eine Auswertung der molaren Massen erfolgen. Dazu wird zunächst das Protein denaturiert, so dass es in seiner Primärstruktur vorliegt. Dazu wird zur Probelösung in geeigneter Verdünnung Reduktionsmittel dosiert (Tabelle 17) und das Restvolumen aufgefüllt. Die Proben werden für 10 min bei 70 °C erhitzt.

**Tabelle 17.** Bedingungen zur Denaturierung von Proteinproben

Reagenz	Probenzusammensetzung
Probe (1 mg/mL Enzym)	4, 6, 8 µl
NuPAGE® LDS Probenpuffer	5 µl
NuPAGE® Reduktionsmittel	2 µl
Reinstwasser	9, 7, 5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Die Proben werden in die Wells (Probentaschen) gefüllt und die Gelelektrophorese unter den in Tabelle 18 zusammengefassten Bedingungen, gestartet.

**Tabelle 18.** Bedingungen der Gelelektrophorese

Größe	Startwert - Endwert
Spannung	75 V (konst.)
Stromstärke	47–22 mA
Leistung	3,5–1,6 W
Zeit	113 min

Das Gel wird nun mit Reinstwasser gewaschen, wobei der Waschprozess unter Verwendung einer Labormikrowelle 45 s bei 950 W durchgeführt wird. Im Anschluss wird zur Waschlösung 20 mL der SimplyBlue SafeStain Lösung geben und zur Anfärbung erneut 45 s in der Mikrowelle erhitzt. Nach erneutem Waschen mit 20 %ige NaCl-Lösung kann das Gel mehrere Wochen gelagert werden. Für die Auswertung wird der Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der molaren Masse und der Laufstrecke der Banden genutzt. Aus der so erstellten Kalibrierung kann das Molgewicht der unbekannten Probe bestimmt werden.

#### 6.5.4. Bestimmung des Eisengehaltes des Enzymrohextraktes

Um das für die Untersuchungen verwendete Enzym zu kategorisieren, wurde der Eisengehalte des Lyophilisates bestimmt. Die Messung wurde an einem ICP-OES IRIS INTREPID II der Firma Thermo-Fisher durchgeführt. Dazu wurde eine Lösung von 0,1 mg/mL Lyophilisat ohne weitere Vorbehandlung verwendet. Die Messung erfolgte über zwei verschiedene Emissionswellenlängen. Zum einen erfolgte die Analyse für eine Wellenlänge von 238,2 nm und zum anderen für 259,9 nm. Beide Wellenlängen lieferten nahezu identische Konzentrationen, so dass die erhaltenen Ergebnisse gemittelt wurden.

#### 6.5.5. Empirische Berechnung der Ionenstärke aus der Leitfähigkeit des enzymatischen Systems

Im Rahmen der Arbeit wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Ionenstärke untersucht. Für die Ermittlung der Ionenstärke wurden Substratlösungen unter Verwendung von 0,73 mM CPP in den entsprechenden Medien angesetzt und wenn notwendig, der pH-Wert mit Natriumhydroxid und Salzsäure auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Es erfolgte dann die Messung der Leitfähigkeit der Substratstammlösung. Aus diesen Werten wurde durch Gleichung 14 die Ionenstärke ermittelt. [Marion und Babcock, 1976]

$$\lg I = 1,16 + 1,009 \lg \kappa \quad \text{Glg. 13}$$

$$I = 14,45 \cdot \kappa^{1,009} \quad \text{Glg. 14}$$

Dabei ist  $I$  die Ionenstärke in mmol/L und  $\kappa$  die Leitfähigkeit in mS/cm. Die Werte sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

**Tabelle 19.** Leitfähigkeiten und daraus ermittelte Ionenstärken verwendeter Substratlösungen

Medium	$\kappa$ [ $\mu\text{S/cm}$ ]	$I$ [mol/L]
Reinstwasser	198	0,003
entionisiertes Wasser	210	0,003
100 mM NaCl	10610	0,157
150 mM NaCl	15140	0,224
150 mM Puffer	9020	0,133

### 6.5.6. Absorptionsspektren des pH-Sprung- und des enzymatischen Systems

In diesem Abschnitt werden das Absorptionsspektrum des pH-Sprungtriggers und die Spektren der Probelösungen der Aktivierungssysteme dargestellt. In Abbildung 66 wird das Spektrum einer 100  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehydlösung gezeigt.

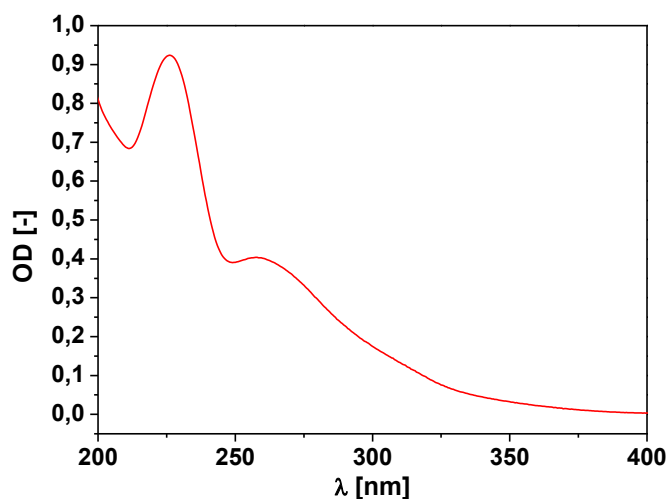
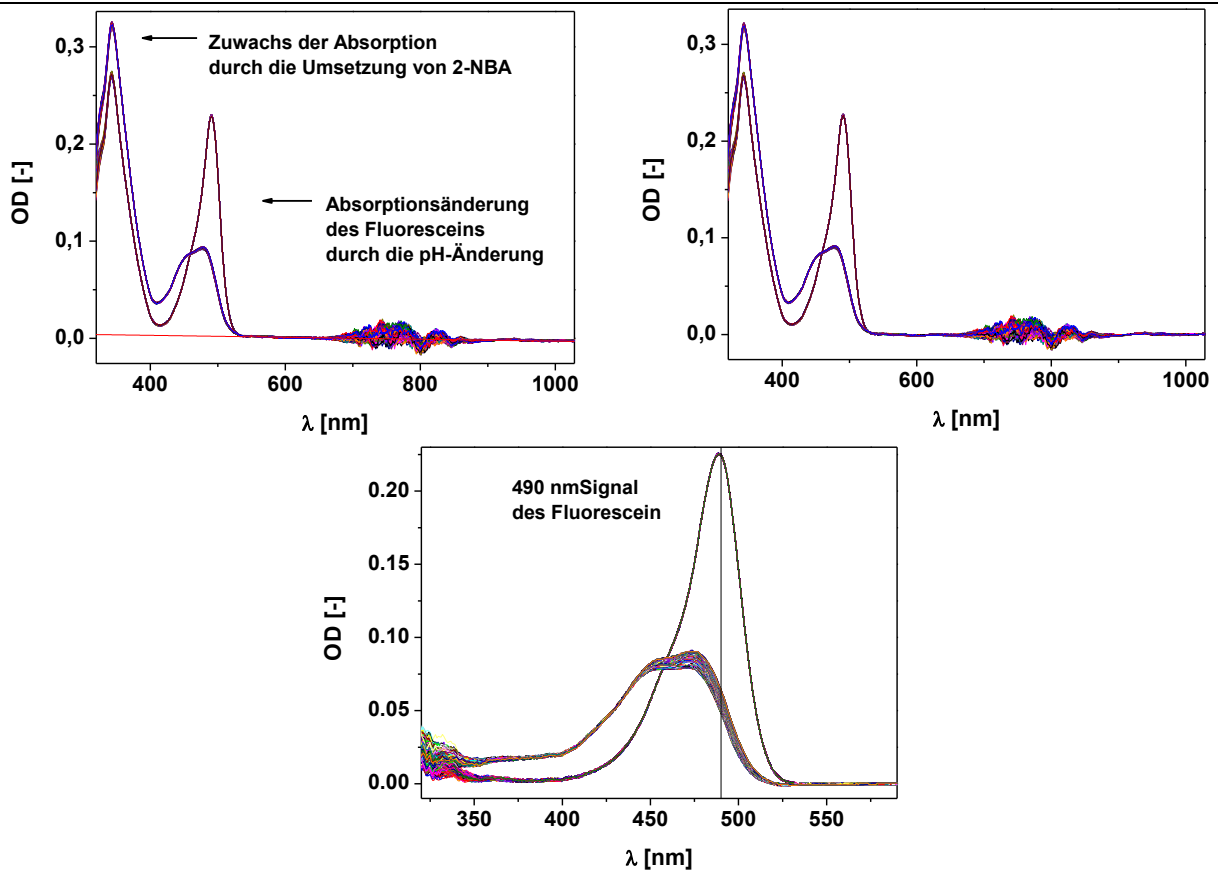


Abbildung 66. Absorptionsspektrum einer wässrigen 100  $\mu\text{M}$  2-Nitrobenzaldehydlösung

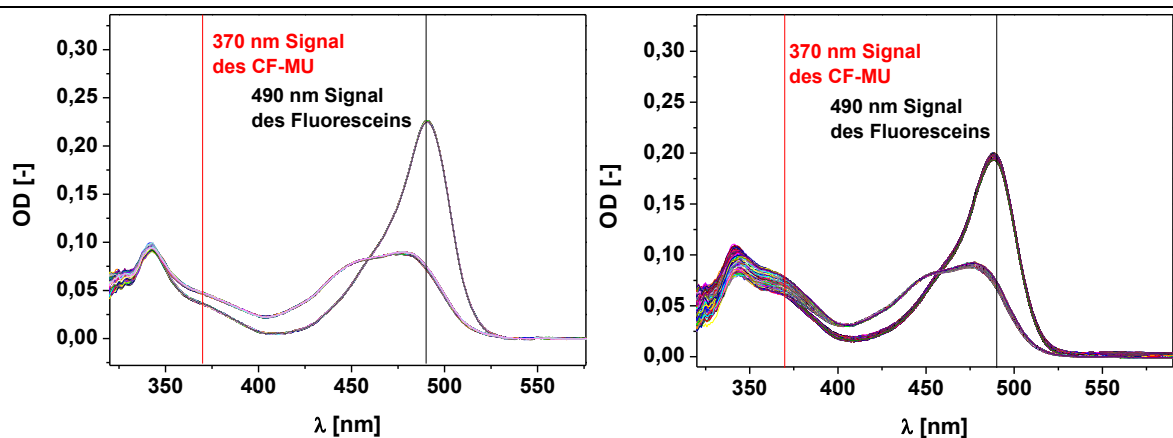
Im Folgenden zeigen die Graphen in Abbildung 67 die Spektren der Realproben von pH-Sprungexperimenten ohne die Existenz des Enzymsystems. Die Spektren sollen veranschaulichen wie bei der Datenauswertung vorgegangen wurde. Im Graph oben links sind die Rohdaten dargestellt. Eine Messreihe, wie sie hier dargestellt ist, besteht aus 1200 bis 2400 Einzelspektren. Man erkennt bei Wellenlängen kleiner 400 nm die Absorptionsschulter des 2-Nitrobenzaldehydes, sowie die Absorption des Fluoresceins vor und nach dem pH-Sprung zwischen 400 nm und 500 nm. Das starke Rauschen zwischen 650 und 900 nm geht auf den verwendeten Langpassfilter (DC-Red) zurück. Die fehlende Transmission in diesem Bereich ist jedoch nicht von Bedeutung, da in diesem Bereich keine Absorptionen erwartet werden.

In einem ersten Schritt wird der hintere Bereich des Spektrums genutzt um eine Funktion für den Untergrund zu ermitteln. Diese wird dann von den Spektren subtrahiert. Die basislinienkorrigierten Spektren sind im oberen rechten Graphen dargestellt. Nach der Basislinienkorrektur werden die Absorptionen bei 490 nm auf die erstellte Kalibrierfunktion angewendet.



**Abbildung 67.** Spektren des pH-Sprungsystems – Vorgang der Auswertung (oben-links: Rohspektren und Fit des Untergrundes; oben-rechts: untergrundkorrigierte Spektren; unten: Spektren nach Abzug des 2-NBA-Signals mit Kennzeichnung der Wellenlänge, die zur Auswertung genutzt wird)

Enthält das Messsystem die enzymatische Komponente, so wird zusätzlich zur Basislinienkorrektur ein Referenzspektrum des 2-Nitrobenzaldehydes (oder der Derivate) vor und nach der Anregung subtrahiert. Abbildung 68 zeigen die resultierenden Spektren für ein System ohne einsetzende enzymatische Reaktion (links) und für ein System mit einsetzender enzymatischer Reaktion.

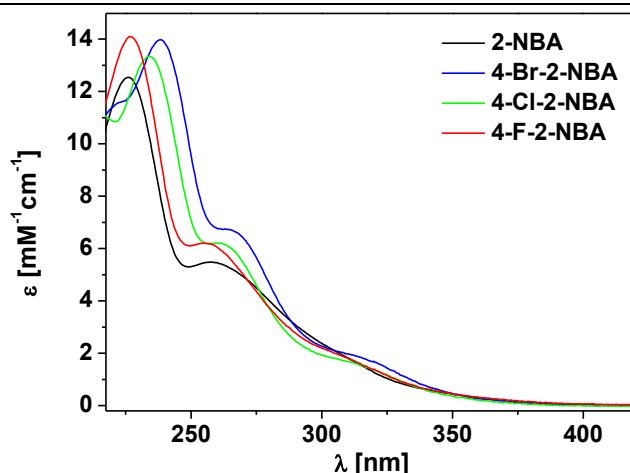


**Abbildung 68.** Spektren des Gesamtsystems der pH-Sprungexperimente nach Untergrundkorrektur und Abzug des 2-NBA-Signals; ohne enzymatische Reaktion (links); mit enzymatischer Reaktion (rechts)

### 6.5.7. Charakterisierung der photoaktivierbaren Substrate

#### 2-Nitrobenzaldehyd und seine halogenierten Derivate

Nach präparativer Umsetzung des 2-Nitrobenzaldehydes und seiner Derivate wurden UV-Vis-Spektren (Specord 50, Analytik Jena) aufgenommen und IR-Spektren (Nicolet 380 FT-IR mit ATR-Einheit, Thermo Scientific) sowie Elementaranalysen (Vario EL III Flash EA 1112, Thermo Quest) durch den analytischen Service des Institutes angefertigt.



**Abbildung 69.** Absorptionsspektren des 2-Nitrobenzaldehydes und der halogenierten 2-Nitrobenzaldehydderivate (100  $\mu\text{M}$  wässrige Lösungen)

#### IR:

	2-NBA <sup>a</sup>	2-NBS <sup>a</sup>	2-NBS	4-F-2-NBS	4-Cl-2-NBS	4-Br-2-NBS
$\nu(\text{C=O})$ (CHO)	1696	-	-	-	-	-
$\nu(\text{C=O})$ (COOH)	-	1700	1682	1693	1693	1688
$\nu(\text{C=O})$ (COO <sup>-</sup> )	-	1570,1385	-	-	-	-
$\nu(\text{NO})$	-	1605	1599	1604	1593	1590
$\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$	1533	-	1538 (min)	1538(min)	1538(min)	1538(min)
$\nu_{\text{sym}}(\text{NO}_2)$	1353	-	-	1347(min)	1347(min)	1345(min)

<sup>a</sup> Literaturwerte nach [Donten *et al.*, 2011], (min) = minimale Spuren

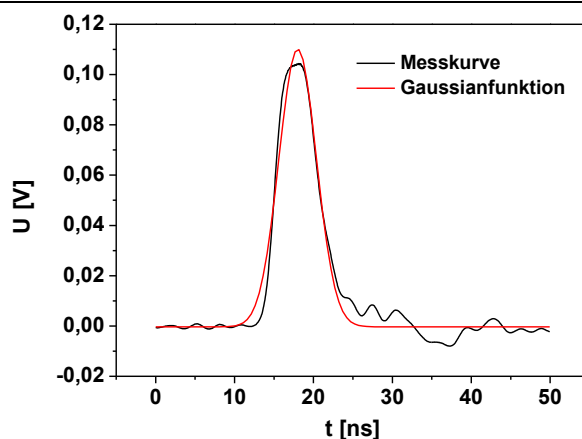
#### Elementaranalyse:

	2-NBS		4-F-2-NBS		4-Cl-2-NBS		4-Br-2-NBS	
	Gehalt <sub>Theorie</sub> [%]	Gehalt <sub>list</sub> [%]	Gehalt <sub>Theorie</sub> [%]	Gehalt <sub>list</sub> [%]	Gehalt <sub>Theorie</sub> [%]	Gehalt <sub>list</sub> [%]	Gehalt <sub>Theorie</sub> [%]	Gehalt <sub>list</sub> [%]
C	55,63	55,64 55,79	49,72	50,09 50,05	45,31	45,90 45,64	36,55	36,93 36,91
H	3,33	3,72 3,73	2,38	2,69 2,58	2,17	2,66 2,69	1,75	2,23 2,15
N	9,27	9,13 9,16	8,28	8,30 8,27	7,55	7,52 7,51	6,09	6,11 6,05

Eine qualitative Analyse mittels NMR wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Signalzuordnung ist für 2-Nitrosobenzoessäure sehr umfassend, da sie in Lösung in einem komplexen konzentrations- und temperaturabhängigen Monomer-, *E*-Dimer- und *Z*-Dimergemisch vorliegt. Eine Zuordnung wurde in der Literatur von Schaper *et al.* beschrieben. [Schaper, 2008]

### 6.5.8. Charakterisierung des Anregungsstrahlenganges

Die Bestimmung des zeitlichen Pulsprofils wurde bereits in Abschnitt 3.3.2 dargestellt. Die Bestimmung erfolgte dabei mehrfach. In guter Übereinstimmung wurde die Halbwertsbreite von 6 ns ermittelt. In Abbildung 70 ist die graphische Auswertung der zweiten Messung dargestellt.

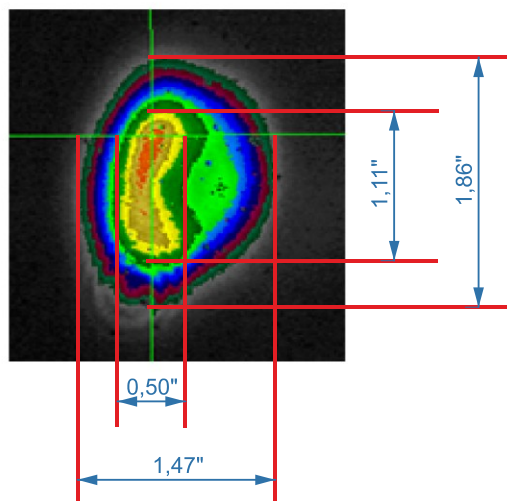


**Abbildung 70.** Zeitliches Pulsprofil des Anregungsstrahls (Messung bei 100 % output und 180  $\mu$ s Q-Switch; abgeschwächt durch ND-Filter)

### 6.5.9. Betrachtung der Diffusion in wässriger Lösung

Aus der Lösung des zweiten Fickschen Gesetzes ergibt sich für das mittlere Verschiebungsquadrat  $\langle x^2 \rangle^{1/2} = \sqrt{2Dt}$ . [Atkins und Paula, 2013] Für Protonen bzw. Hydroniumionen ist unter Berücksichtigung des Grotthus Mechanismus in der Literatur ein Diffusionskoeffizient von  $D = 9,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  bekannt. [Wraight, 2006] Es ergibt sich daraus für eine Zeit von 10 s eine Wegstrecke von 0,43 mm.

Betrachtet man das Strahlprofil des Anregungsstrahlenganges, so ist eine örtliche Inhomogenität zu beobachten (Abbildung 71). Es werden lediglich 0,5 mm in x-Richtung und 1,11 mm in y-Richtung nahezu homogen ausgeleuchtet. Die dort erzeugten Protonen bzw. die entstehenden Hydroniumionen legen allerdings in den ersten 10 s nach der Anregung 0,43 mm zurück.



**Abbildung 71.** Örtliche Inhomogenitäten des Anregungsstrahlenganges (Anregungssystem b nach Optimierung des Strahlprofils)

Das bedeutet, dass für die Argumentation des detektierten pH-Wert-Anstieges im Sekunden-Bereich Diffusionseffekte plausibel sind. Innerhalb von 26 ms beträgt die mittlere Wegstrecke nur rund  $22\ \mu\text{m}$  und innerhalb von 250 ms dann  $68\ \mu\text{m}$ . Daher sind Diffusionseffekte als Grund für den Anstieg des pH-Wertes auf dieser Zeitskala unwahrscheinlich.

#### 6.5.10. Einfluss der Laserstrahlung auf die enzymatische Aktivität

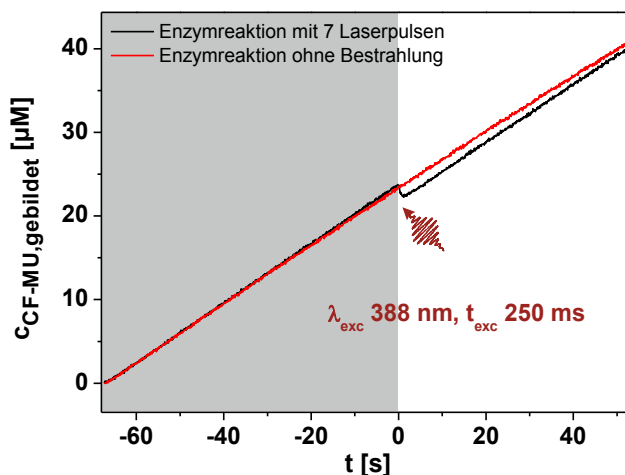
In Tabelle 20 und Abbildung 72 werden die Ergebnisse der Stabilitätstests zusammengefasst. Bei Betrachtung der Messreihen ist zu erkennen, dass die Enzymaktivität nach der Anregung um ca. 2 % zurückgeht gegenüber der Zeit vor der Anregung. Aber auch für die Referenzproben ohne Anregung lässt sich ein leichter Rückgang der Aktivität nach 60 s beobachten. Hier beträgt die Abnahme rund 6 %.

**Tabelle 20.** Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase unter Einfluss der Anregungsstrahlung mit einer Wellenlänge von 355 nm (Inkubation:  $T = 21\ ^\circ\text{C}$ ; Assay: Hydrolyse von CF-MUP; 0,04 mg/mL Phosphatase;  $T = 21\ ^\circ\text{C}$ ; 150 mM Acetatpuffer pH 5,5; Detektion: Absorptionsmessung bei 370 nm; Bestrahlung bei  $\lambda_{\text{ex}} = 355\ \text{nm}$  für 7 ms)

Probe	$A_{\text{Referenz}}$ 0s-60s [U/mg]	$A_{\text{Referenz}}$ 60s-120s [U/mg]	$A_{\text{vor Anregung}}$ 0s-60s [U/mg]	$A_{\text{nach Anregung}}$ 60s-120s [U/mg]
1	-	-	0,531	0,526
2	0,526	0,499	0,533	0,519
3	0,533	0,497	0,517	0,506



Da die Schwankungsbreite der Messung um 5 bis 10 % liegt, ist der Aktivitätsverlust über die Zeit als gleich anzusehen. Es kann daher also von einer verlustfreien Anregung ausgegangen werden. Betrachtet man den Verlauf der enzymatischen Umsetzung, so zeigt sich, anders als bei Anregung mit 388 nm, ein scheinbarer Einbruch der Enzymaktivität unmittelbar nach der Anregung. Um dies zu verdeutlichen ist in Abbildung 72 die Produktbildung aus der enzymatischen Reaktion zeitlich aufgetragen. Dabei ist sowohl die Referenz- als auch die bestrahlte Probe im Vergleich dargestellt.

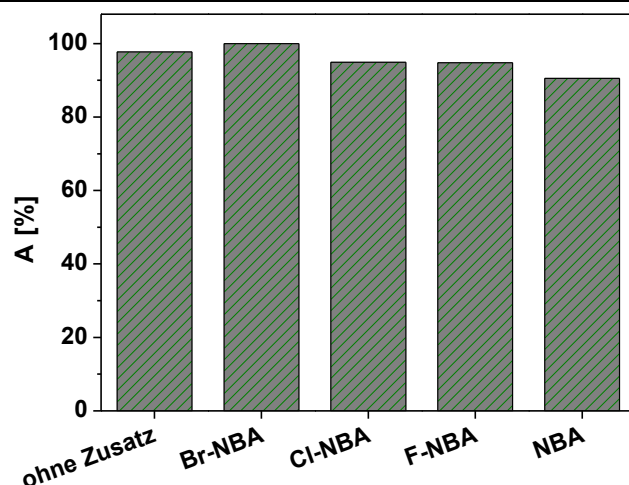


**Abbildung 72.** Einfluss der Anregungsstrahlung auf die Hydrolyseaktivität der sauren Phosphatase (Inkubation:  $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Assay: Hydrolyse von CF-MUP; 0,04 mg/mL Phosphatase;  $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 150 mM Acetatpuffer pH 5,5; Detektion Absorptionsmessung bei 370 nm; Bestrahlung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 355\text{ nm}$  für 7 ms)

Unmittelbar nach Anregung der Probelösung kann ein Rückgang der optischen Dichte des Substrat-/Produktgemisches beobachtet werden. Diese Abnahme wurde aber auch für die Standard-Substrat-/Produktgemische der Kalibrierung beobachtet. Daher ist der vermeintliche Aktivitätseinbruch als Photobleaching des Substrat-/Produktgemisches bedingt durch die eingebrachte Strahlung zu werten. Bei vorherigen Messungen mit einer Anregungszeit von 250 ms wurde dieser Effekt nicht detektiert. Dennoch ist es möglich, dass auch hier ein Photobleaching aufgetreten ist. Zum einen wurden diese Messungen mit einer geringeren Zeitauflösung gemessen und zum anderen mussten zumeist die mehrere Spektren nach der Anregung in der Auswertung aufgrund einer Übersättigung des Detektors verworfen werden.

### 6.5.11. Einfluss der Triggersubstrate auf die enzymatische Aktivität

In Abbildung 73 ist die Abhängigkeit der Aktivität von der Struktur der Triggersubstrate dargestellt.

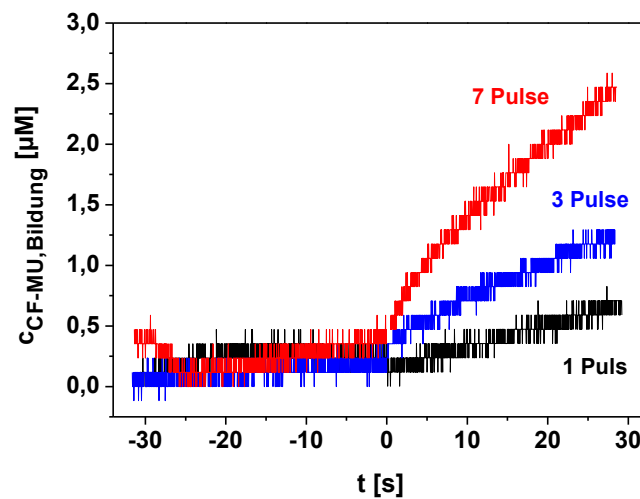


**Abbildung 73.** Einfluss des 2-Nitrobenzaldehydes und der verwendeten Halogenderivate auf die enzymatische Aktivität (Inkubation:  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Assay:  $100\text{ }\mu\text{M}$  photoaktivierbare Verbindung; Hydrolyse von CF-MUP;  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $0,02\text{ mg/mL}$  Phosphatase; Lösungsmittel Acetatpuffer pH 5,5) [Höhne, 2012]

Es zeigt sich zunächst, dass die Aktivität durch Zugabe von 2-Nitrobenzaldehyd um 7,4 % abnimmt. Dass bedeutet der Aktivitätsverlust ist höher als der in Abschnitt 4.2.5, mit 1 %, ermittelte. Dennoch liegt hier auch wie in den Messungen zuvor die Restaktivität bei über 90 % und damit in derselben Größenordnung. Vergleicht man jetzt den Einfluss der zusätzlichen Substituenten auf die Aktivität, so ist sichtbar, dass die Aktivität durch die Halogenierung der Nitrobenzaldehyde weniger stark beeinflusst wird. Der Aktivitätsverlust durch die Anwesenheit der halogenierten Derivate liegt bei allen Derivaten unter 5 % und somit innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung. Durch Einführung eines zusätzlichen Substituenten nimmt die räumliche Ausdehnung der Moleküle zu. Die Größe der Moleküle und der damit eventuell verbundene erschwerte Zugang zur Bindungsstelle im Enzym könnte eine Möglichkeit für den verminderten Einfluss auf die Aktivität sein. Zusätzlich besitzen die Halogensubstituenten eine negative Ladungsdichte, die ebenfalls zur Beeinträchtigung der Wechselwirkungen mit dem Enzym beitragen könnte. Ein möglicher Trend innerhalb der halogenierten Nitrobenzaldehyde soll an dieser Stelle nicht diskutiert werden, da wie bereits angedeutet die Unterschiede der absoluten Aktivitäten innerhalb der Fehlergrenzen liegen.

### 6.5.12. Abhängigkeit der Enzymaktivierung von der Anzahl der Anregungspulse

In Abschnitt 4.4.1 wiesen die Messdaten aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung und der geringen Änderung der Produktkonzentration ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf. Aus diesem Grund wurden die Kurven einer Glättung unterzogen. An dieser Stelle sollen die Originalmessdaten dargestellt werden.



**Abbildung 74.** Laserinduzierte Aktivierung der enzymatischen Hydrolyse in Abhängigkeit der Anregungszeit ( $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$ ;  $P = 2,4 \text{ W}$ ;  $t_{exc} = 1, 3, 7 \text{ Pulse}$ ;  $0,04 \text{ mg/mL}$  saure Phosphatase +  $83,3 \text{ μM}$  CF-MUP in  $150 \text{ mM}$  Acetatpuffer pH 5,5) – Originalmesskurven

---

## Liste der Veröffentlichungen, Vortrags- und Posterbeiträge

### Publikationen:

- Wenda, S., Illner, S., Mell, A. und Kragl, U. "Industrial Biotechnology – The future of green chemistry?" *Green Chemistry* (2011) 13: 3007-3047.
- Kohse, S., Neubauer, A., Pazidis, A., Lochbrunner, S., Kragl, U. "Photoswitching of enzyme activity by laser-induced pH-jump" *Journal of the American Chemical Society* (2013) 135 (25): 9407–9411.

### Poster:

- Wenda, S., Neubauer, A., Hellmuth, F., Lochbrunner, S. und Kragl, U. (2010). "*Dynamical Analysis of Enzymatic Reactions Using Ultra-short Laser Pulses.*" Posterbeitrag beim 2. Interdisziplinären Forschungsseminar der Interdisziplinären Fakultät der Universität Rostock 03/2010 (Deutschland, Warnemünde)
- Wenda, S., Neubauer, A., Fennel, F., Lochbrunner, S. und Kragl, U. (2010). "*Einfluss ultrakurzer Laserpulse auf die Hydrolyseaktivität saurer Phosphatasen.*" Posterbeitrag auf der 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung 2010, 09/2010 (Deutschland, Eurogress – Aachen)
- Wenda, S., Neubauer, A., Lochbrunner, S. und Kragl, U. (2011). "*Laser-induced pH-jump for time-resolved studies of pH-dependent enzymatic reactions.*" Posterbeitrag auf dem 1st European Congress of Applied Biotechnology together with 8th European Congress of Chemical Engineering, 09/2011 (Deutschland, ICC – Berlin)
- Wenda, S., Neubauer, A., Lochbrunner, S. und Kragl, U. (2013). "*Screening Trigger Substrates for Laser-Induced Enzyme Activation.*" Posterbeitrag auf der Biotrans2013, 07/2013 (Vereinigtes Königreich, Manchester Central – Manchester)